



Université de Sherbrooke

**Implication de deux nouveaux partenaires d'interaction de la Caspase-6, DAXX et STK3, dans le vieillissement et la maladie de Huntington**

Par  
Mélissa Lessard-Beaudoin  
Programmes de maîtrise en Physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc) en Physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada  
Juin 2016

Membres du jury d'évaluation  
Pre Rona K. Graham, programme de Physiologie  
Pre Christine Lavoie, programme de Pharmacologie  
Pre Melanie Plourde, programme de Physiologie

© Mélissa Lessard-Beaudoin, 2016

## RÉSUMÉ

### **Implication de deux nouveaux partenaires d'interaction de la Caspase-6, DAXX et STK3, dans le vieillissement et la maladie de Huntington**

Par

Mélissa Lessard-Beaudoin

Programmes de maîtrise en Physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en Physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La neurodégénérescence fait partie intégrante de la maladie de Huntington (MH) dont les premiers symptômes moteurs et cognitifs apparaissent vers l'âge de 30 à 40 ans. Cette maladie incurable est causée par une mutation dans le gène codant pour la protéine huntingtin (htt). L'activation de la caspase-6 (casp6) est observée au stade présymptomatique chez l'humain et les modèles murins MH faisant de la casp6 un joueur majeur dans la neurodégénérescence précoce associé à la MH. De plus, le clivage de htt mutant par la casp6 produit un fragment N-terminal neurotoxique essentielle au développement de la MH. Des résultats préliminaires ont permis de révéler l'interaction et le clivage des protéines proapoptotiques Serine/Threonine Kinase 3 (STK3), Death-Domain Associated Protein (DAXX) par la casp6. Des effets proapoptotiques sont associés à leurs fragments et leur production par les caspases pourrait influencer la neurodégénérescence observée dans diverses maladies neurodégénératives et dans le vieillissement normal.

Nos résultats dans les souris C57Bl/6 démontrent que l'expression de DAXX varie fortement avec l'âge selon l'organe analysé. Ses divers fragments ne suivent pas la même tendance d'un organe à l'autre suggérant des fonctions différentielles à travers l'organisme et une importante régulation de ses fonctions par des modifications post-traductionnelles. Chez les modèles murins de la MH, les souris YAC128, nous avons constaté une augmentation des fragments à 65 et 70 kDa dans le cortex et une diminution de DAXX entier et du fragment à 70 kDa dans le cervelet soulignant la possibilité de fonctions spécifiques selon les régions cérébrales. Nous avons aussi démontré pour la première fois le clivage de STK3 par la caspase-7 et la production différentielle de fragments par les caspase-3, 6 et 7. L'expression protéique de STK3 augmente globalement à travers l'organisme avec l'âge et dans le cervelet des souris YAC128. Par contre, une diminution de l'expression de STK3 est observée dans le cortex des individus atteints de la MH et des souris YAC128. Finalement, par l'induction de différents stress cellulaires, nous avons constaté la présence d'un mécanisme adaptatif des neurones modèles de la MH impliquant STK3.

En conclusion, l'expression de DAXX et STK3 varie avec l'âge à travers l'organisme et est altérée dans la maladie de Huntington. Plus particulièrement, STK3 semble être impliqué dans un mécanisme protégeant les neurones de la mort cellulaire dans la MH.

**Mots clés :** caspase, Death-domain associated protein 6 (DAXX), Sérine-Thréonine kinase 3 (STK3), vieillissement, maladie de Huntington, YAC 128.

# TABLE DES MATIERES

<b>Résumé .....</b>	<b>ii</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>iii</b>
<b>Liste des figures et des tableaux .....</b>	<b>vi</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>viii</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Viellissement.....</b>	<b>1</b>
Dérèglements cellulaires.....	1
Stress oxydatif .....	1
Homéostasie du calcium .....	2
Protéasome .....	4
<b>Maladie de Huntington.....</b>	<b>4</b>
Symptômes .....	4
Neuropathologie.....	5
Mutation et son impact sur la protéine htt.....	6
Activation des caspases et leurs rôles dans la maladie .....	8
Modèles de la maladie .....	9
Modèles murins.....	9
Modèles cellulaires .....	11
<b>Apoptose .....</b>	<b>12</b>
Voie extrinsèque.....	13
Voie intrinsèque .....	13
Caspases dans la maladie de Huntington et le vieillissement.....	15
<b>Découverte de nouveaux partenaires d'interaction de caspase 6 .....</b>	<b>15</b>
Identification de substrats potentiels.....	16
<b>Daxx .....</b>	<b>17</b>
Voies de signalisation et fonctions cellulaires .....	17
Localisation intracellulaire .....	17
Fonctions.....	18
Modifications post-traductionnelles.....	19
Protéolyse.....	19
Implication dans la neurodégénérescence .....	22
<b>STK3.....</b>	<b>23</b>
Voies de signalisation.....	23



Modifications post-traductionnelles.....	24
Protéolyse.....	25
Implication dans la mort cellulaire et la neurodégénérescence.....	26
<b>Hypothèse/problématique .....</b>	<b>27</b>
<b>Article 1.....</b>	<b>28</b>
<b>Article 2.....</b>	<b>53</b>
<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>95</b>
<b>Modèle animale .....</b>	<b>95</b>
Étude sur le vieillissement.....	95
Étude sur la maladie de Huntington.....	95
<b>Analyse de l'expression .....</b>	<b>95</b>
Expression protéique et immunobuvardage de type Western.....	95
Réaction en chaîne par polymérase en temps réel (RT-PCR).....	96
<b>Essai de clivage .....</b>	<b>97</b>
<b>Essai d'activité de caspases .....</b>	<b>97</b>
<b>Culture cellulaire .....</b>	<b>98</b>
Modèles cellulaires.....	98
Induction de stress cellulaires.....	98
Déprivation de sérum.....	98
Stimulation au NMDA.....	98
Essai lactate déshydrogénase .....	98
<b>Résultats .....</b>	<b>99</b>
<b>Maladie de Huntington.....</b>	<b>99</b>
Dérèglement de l'expression et du clivage de DAXX dans la maladie de Huntington .....	99
Dérèglement de l'expression et du clivage de STK3 dans la maladie de Huntington .....	104
Dérèglement de l'expression de DAXX et STK3 lors de stress cellulaires dans des modèles cellulaires de la maladie de Huntington .....	108
<b>Discussion .....</b>	<b>115</b>
<b>Analyse des phénomènes apoptotiques dans les processus du vieillissement.....</b>	<b>115</b>
Expression de DAXX dans le vieillissement .....	115
Expression de STK3 dans le vieillissement.....	116
Expression des caspases dans le vieillissement.....	117
Activité des caspases avec le vieillissement.....	118
<b>Analyse des altérations de DAXX dans la maladie de Huntington .....</b>	<b>119</b>

<b>Analyse des altérations de STK3 dans la maladie de Huntington .....</b>	<b>121</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>125</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>126</b>
<b>Annexe 1: Western blot de DAXX .....</b>	<b>127</b>
<b>Annexe 2: Western blot de STK3 .....</b>	<b>129</b>
<b>Liste des références .....</b>	<b>132</b>

## LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

### Introduction :

Figure 1. Neuropathologie de la Maladie de Huntington .....	6
Figure 2. Mutation à l'origine de la Maladie de Huntington .....	8
Figure 3. Important rôle de caspase-6 dans la maladie de Huntington .....	9
Figure 4. Activation des caspases. ....	13
Figure 5. Voies de signalisation apoptotiques .....	14
Table 1. Composantes de la voie Hippo chez la drosophile et les mammifères. ....	24
Figure 7. Rôle proapoptotique de la Sérine/Thréonine kinase 3 (STK3). ....	25

### Matériel et méthodes :

Table 1. Séquences des amorces utilisées pour ce projet. ....	97
---	----

### Résultats :

Figure 1 Aucune variation de l'ARNm de DAXX chez les souris YAC128.....	99
Figure 2 Effet de l'âge sur l'expression de fragments de DAXX dans le cortex des souris YAC 128 .....	101
Figure 3 Effet de l'âge sur l'expression de DAXX dans le cervelet des YAC 128 .....	102
Figure 4 Diminution de DAXX et de ces fragments dans le cortex d'individu atteint de la maladie de Huntington .....	103
Figure 5 Diminution du fragment à 65 kDa DAXX dans le striatum d'individus atteints de la maladie de Huntington .....	104
Figure 6 Effet de l'âge et du génotype sur l'expression de l'ARNm de STK3 dans le cervelet chez les YAC128 .....	105
Figure 7 Aucun effet de l'âge et du génotype sur l'expression de STK3 dans le cortex des souris YAC128.....	106
Figure 8 Aucun effet de l'âge et du génotype sur l'expression de STK3 dans le cervelet des souris YAC128.....	106
Figure 9 Diminution de l'expression de STK3 dans le cortex d'individu atteints de la maladie de Huntington .....	107
Figure 10 Diminution de l'expression de STK3 dans le striatum d'individu atteints de la maladie de Huntington .....	107
Figure 11 Augmentation de la relâche de LDH dans le milieu cellulaire des cellules Q7 et Q111 suite à une déprivation de sérum .....	109
Figure 12 Augmentation du clivage de DAXX après 3h de déprivation de sérum chez les cellules Q7 et Q111 .....	110
Figure 13 Clivage différentiel de STK3 selon le type cellulaire lors d'une déprivation de sérum .....	111

Figure 15 Augmentation de la relâche de LDH dans le milieu des cellules Q7 et Q111 suite à la stimulation au NMDA.....	112
113	

Figure 16 Aucune variation significative de l'expression de DAXX suite à une stimulation au NMDA.....	113
---	-----

Figure 15 Augmentation du clivage de STK3 dans les cellules Q7 suite à une stimulation au NMDA.....	114
---	-----

## **Discussion :**

Table 1. Résumé des résultats d'expression de STK3 dans la maladie de Huntington. Les flèches indiquent les variations d'expression de STK3 dans les tissus murins (C57BL6 ou YAC128) ou humains. Les « X » signifient que le résultat n'a pas encore été obtenu et les « - » indiquent une absence de variation de l'expression de STK3. ....	122
--	-----

Table 2. Résumé des résultats d'expression protéique de STK3 lors de deux stimulations cellulaires différents Les variations indiquées sont comparées aux contrôles. Le signe « - » correspond à une absence de variation.....	123
--	-----

Figure 17. Mécanisme adaptatif des cellules STHdhQ111 suite à la suractivation prolongée du récepteur NMDA .....	124
--	-----

## **Figures supplémentaires :**

Figure 1. Immunobuvardage de DAXX dans le cortex des souris YAC128 .....	127
--	-----

Figure 2. Immunobuvardage de DAXX dans le cervelet des souris YAC128 .....	127
--	-----

Figure 4. Immunobuvardage de DAXX dans le striatum d'individus atteints de la maladie de Huntington .....	128
---	-----

Figure 5. Immunobuvardage de DAXX dans le cortex d'individus atteints de la maladie de Huntington .....	128
---	-----

Figure 1. Immunobuvardage de STK3 dans le cortex des souris YAC128 .....	129
--	-----

Figure 2. Immunobuvardage de STK3 dans le cervelet des souris YAC128 .....	129
--	-----

Figure 3. Immunobuvardage de STK3 dans le striatum d'individus atteints de la maladie de Huntington .....	130
---	-----

Figure 4. Immunobuvardage de STK3 dans le cortex d'individus atteints de la maladie de Huntington .....	130
---	-----

Figure 5. Immunobuvardage de STK3 lors d'une déprivation de sérum chez les cellules Q7 et Q111.....	131
---	-----

Figure 6. Immunobuvardage de STK3 lors d'une stimulation des cellules Q7 et Q111 au NMDA .....	131
--	-----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Akt	<i>Protein kinase B</i> ; protéine kinase B
AMPA	Acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
APP	<i>Amyloid precursor protein</i> ; protéine précurseur de l'amyloïde
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> ; acide bicinchoninique
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
c-abl	<i>Abelson Tyrosine-Protein Kinase</i>
CASP	<i>Caspase</i>
CBP	<i>CREB-binding protein</i> ; Protéine de liaison à CREB
CD95	<i>Cluster of differentiation 95</i> ; Groupe de différenciation 95
CREB	<i>C-AMP Response Element-binding protein</i> ; Protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMP cyclique
CRM1	<i>Chromosomal Maintenance 1</i>
DAXX	<i>Death domain-associated protein 6</i> ; Protéine associée au domaine de mort cellulaire 6
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DTT	<i>Dithiothréitol</i>
EDTA	<i>Acide éthylène-diamine-tétraacétique</i> acide édétique
EGFR	<i>Epithelial growth factor receptor</i> ; Récepteur au facteur de croissance épithéliale
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> ; Kinase régulé par des signaux extracellulaire
Fas	<i>FAS receptor (CD95)</i> ; Récepteur Fas (CD95)
FasL	<i>Fas ligand</i>
FBS	<i>Fœtal bovin serum</i> ; Sérum de veau fœtal
FLASH	<i>CASP8-associated protein 2</i> ; Protéine associée à CASP8 2
FOXO	<i>Forkhead box O</i>
GRX	<i>Glutaredoxine</i>
GSH	<i>Glutathion</i> ; Glutathione

HIPK	<i>Homeodomain-interacting protein kinase</i> ; Protéine kinase interagissant avec un homeodomaine
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> ; Peroxydase de raifort
htt	<i>Huntingtin</i>
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis</i> ; Inhibiteur de l'apoptose
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KIBRA	<i>Kidney and brain expressed protein</i> ; Protéine exprimée dans les reins et le cerveau.
LDH	<i>Lactate deshydrogenase</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> ; Lipoprotéine de basse densité
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Mdm2	<i>Murine double minute 2</i>
MPTP	<i>1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine</i>
MST	<i>Mammalian sterile-20-like</i>
myc	<i>Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog</i>
NMDA	<i>Acide N-méthyl-D-aspartique</i>
p38	<i>P38 mitogen-activated protein kinases</i>
p53	<i>Tumor protein p53</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> ; Tampon phosphate salin
PML	<i>Progressive multifocal leukoencephalopathy</i>
PML-NBs	<i>PML-nuclear bodies</i> ; Corps nucléaires PML
Ro52	<i>E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> ; Espèces réactives de l'oxygène
RT-PCR	<i>Real time polymerase chain reaction</i> ; Réaction en chaîne par polymérase en temps réel
RyR	<i>Ryanodin receptor</i> ; Récepteur de la ryanodine
STK	<i>Serine-threonine kinase</i> ; Sérine-Thréonine kinase
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier protein</i>
TAZ	<i>Tafazzin</i>
TEAD	<i>TEA Domain Family Member (SV40 Transcriptional Enhancer Factor)</i> ; Membre de la famille TEA domaine (Facteur activateur de la transcription

	SV40)
TRX	<i>Thioredoxine</i>
WT	<i>Wild-type</i> ; Type sauvage
YAC	<i>Yeast artificial chromosome</i> ; Chromosome artificiel de levure
YAP	<i>Yes-associated protein</i>

# INTRODUCTION

## Vieillessement

Le vieillissement est un processus multifactoriel menant à des changements majeurs aux niveaux cellulaire, tissulaire, organique, bref dans l'organisme en entier augmentant ainsi la susceptibilité à souffrir de diverses maladies. Ce processus serait dû entre autres à l'accumulation de dommage moléculaire et serait donc dépendant de la capacité à maintenir l'intégrité de l'organisme et de la réparation de ces dommages. L'accumulation des dommages cellulaires et moléculaires avec le vieillissement affecte l'intégrité de tous les tissus de l'organisme augmentant ainsi le risque de troubles cardiovasculaires, métaboliques, rénaux, en plus de réduire les capacités motrices et cognitives (Bennett & Madden, 2014, Bernard & Seidler, 2014, Davis, 2014). Bien sûr, divers facteurs influencent l'apparition et l'impact de ces dommages sur l'organisme tel que la génétique, la nutrition et l'environnement (Daradkeh *et al.*, 2014, Mather *et al.*, 2014, Fougere *et al.*, 2015, Santer, 2010). Dans le cadre de ce mémoire, je me concentrerai en particulier sur les dérèglements cellulaires observés dans le vieillissement sous-jacent à ces atteintes tissulaires.

## *Dérèglements cellulaires*

### *Stress oxydatif*

L'exposition aux rayons ultraviolets (UV) résulte en des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides contenus dans la peau. Ils induisent des mutations moléculaires grandement accentuées par la présence de l'oxygène et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ROS sont des molécules ubiquitaires, mais extrêmement instables dus à la présence d'un électron non-pairé dans sa dernière orbite électronique. Cette configuration instable mène à une cascade de réactions dans lesquelles le ROS cherche rapidement à se stabiliser en récupérant un électron d'une autre molécule. Cette réaction en chaîne continuera jusqu'à ce que 2 radicaux se rencontrent et forme un lien covalent grâce à leur électron non-pairé respectif (Lai *et al.*, 2010, Santer, 2010).

Tel que mentionné plus tôt, les ROS sont retrouvés de façon endogène et sont une partie intégrante du métabolisme cellulaire. En effet, des ROS sont générés entre autres dans la chaîne de transport d'électron dans la mitochondrie, la peroxydation des acides gras, la



phagocytose, la contraction du muscle squelettique et les réactions effectuées par le cytochrome P-450. Or, plusieurs mécanismes endogènes produisant des ROS sont affectés par le vieillissement. La phagocytose, un processus requérant des ROS et des oxydants en grande quantité, ainsi que la production de ROS par la contraction des muscles squelettiques est augmentée avec le vieillissement (Lai *et al.*, 2010). De plus, les cellules post-mitotiques telles que les neurones seraient plus vulnérables au vieillissement dû entre autres à cette augmentation du stress oxydatif (Terman *et al.*, 2010, Lai *et al.*, 2010, Santer, 2010).

Les cellules possèdent un arsenal de défense pour empêcher les dommages cellulaires produits par les ROS, nommés antioxydants. Les superoxydes dismutases convertissent les anions superoxydes en  $H_2O_2$  alors que les catalases et la glutathione peroxydase (GSH) décompose le peroxyde en  $H_2O$  et oxygène par la catalase ou en pont disulfure et deux  $H_2O$  pour la GSH. Il a été démontré que le niveau de catalase plasmatique, enzyme convertissant le  $H_2O_2$  en molécule d'eau et d'oxygène, se retrouve augmenté chez les personnes âgées en compensation pour l'augmentation de la production de ROS avec le vieillissement (Lai *et al.*, 2010, Santer, 2010).

En réponse à un stress oxydatif, la cellule exposée augmente l'expression des enzymes possédant des capacités antioxydants, des protéines chaperones et des enzymes responsables de la réparation de l'ADN rétablissant la conformation des protéines et l'ADN endommagé et/ou altérées et par les ROS. En plus de ces mécanismes de défenses et de réparation, la cellule augmentera aussi l'expression de gènes reliés à la mort cellulaire (Lai *et al.*, 2010, Santer, 2010).

### *Homéostasie du calcium*

Le transport du calcium est hautement régulé afin de maintenir sa concentration intracellulaire relativement basse en contraste avec les concentrations extracellulaires qui sont nettement plus élevées. Cet équilibre est crucial au bon fonctionnement de divers mécanismes cellulaires tels que la contraction des cellules musculaires, la relâche de neurotransmetteurs, la conduction de potentiels d'action, la régulation de gènes encodant pour des éléments du cytosquelette et l'équilibre entre la survie et la mort cellulaire (Giorgi *et al.*, 2015, Annunziato *et al.*, 2002, Orrenius *et al.*, 2015). Les basses concentrations de calcium sont maintenues via la régulation de l'entrée des ions dans la cellule et le stockage

intracellulaire du calcium. La régulation de l'influx calcique est effectuée par divers canaux et transporteurs, certains étant voltages dépendent et peuvent être spécifiques ou non au calcium. Le récepteur NMDA est un récepteur au glutamate perméable aux cations  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ . Au potentiel membranaire de repos, ce récepteur est bloqué par un ion  $\text{Mg}^{2+}$ . L'activation requiert donc (1) la liaison d'un agoniste naturelle (glutamate) ou synthétique (NMDA) (2) la liaison d'un cofacteur tel que la glycine et (3) une dépolarisation membranaire (Kandel *et al.*, 2012).

Des dérèglements sont observés dans divers canaux calciques avec le vieillissement. Par exemple, la densité de canaux calciques fonctionnels de type L disponibles à la fente synaptique augmente avec l'âge dans les neurones CA1 de l'hippocampe chez le rat, affectant grandement le taux de calcium intracellulaire (Landfield, 1996). Il a aussi été démontré que l'expression du récepteur NMDA, formé de deux sous-unités NR1 et deux NR2 (NR2A, NR2B, NR2C et NR2D), est altérée dans le vieillissement. Notamment, l'ARNm de la sous-unité NR1 diminue dans l'hypothalamus des rats Sprague-Dawley et dans le cortex et l'hippocampe des souris C57Bl/6. De plus, au niveau protéique, l'expression des sous-unités NR1 et NR2B diminue avec l'âge chez les souris C57Bl/6. Ces changements dans l'expression des sous-unités altèrent la composition du récepteur et seraient possiblement la cause de la diminution de liaison du L-glutamate avec l'âge observé dans le cortex et l'hippocampe de différents rongeurs et primates (Magnusson, 1998).

Diverses maladies neurodégénératives ont aussi été associées à un dérèglement dans l'homéostasie du calcium. Par exemple, dans la maladie d'Alzheimer, les mutations des présénilines sont associées à une modification dans la sensibilité ou l'expression des canaux de relâche calcique du réticulum endoplasmique (RyR et  $\text{IP}_3\text{R}$ ) et à une accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les neurones de souris transgénique pour la maladie d'Alzheimer (Del Prete *et al.*, 2014). De plus, dans la maladie de Huntington, la présence de la protéine huntingtin (htt) mutante facilite la relâche de  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum endoplasmique ce qui a pour conséquence de faciliter des dysfonctionnements cellulaires associés au calcium (Celsi *et al.*, 2009).

### *Protéasome*

La principale fonction du protéasome est de dégrader les protéines endommagées, mal repliées ou à courte durée de vie. Ce processus est demandant énergétiquement, car de l'ATP est non seulement requis pour l'assemblage des multiples sous-unités du protéasome, mais est aussi essentiel pour la dégradation des substrats (Santer, 2010). Or, la production d'ATP par les mitochondries décline graduellement avec l'âge affectant diverses fonctions vitales, tel le processus de dégradation des protéines (Li & Li, 2011). De plus, l'augmentation du stress oxydatif pourrait créer le cross-linking de certaine protéine ce qui diminuerait l'activité du protéasome et la diminution de l'efficacité des mécanismes de dégradation protéique observée avec l'âge dans diverses études (Breusing & Grune, 2008b, Ward, 2002, Keller *et al.*, 2004, Ferrington *et al.*, 2005, Carrard *et al.*, 2002). Ces altérations peuvent alors mener à l'accumulation de protéines endommagées ou toxiques ou à l'accumulation de protéines ayant normalement une courte durée de vie.

Tel qu'expliqué plutôt, plusieurs dérèglements cellulaires observés lors du vieillissement sont aussi présents dans des maladies neurodégénératives. Par exemple, l'homéostasie du calcium est dérégulée par la protéine htt mutée lors de la maladie de Huntington. Des cellules neuronales modèles de la maladie de Huntington démontrent aussi des altérations du métabolisme énergétique, des altérations dans l'activité du récepteur NMDA et des voies sous-jacentes et un ralentissement du cycle cellulaire (Gines, Ivanova, *et al.*, 2003, Saavedra *et al.*, 2010, Gines, Seong, *et al.*, 2003). Dans la section suivante, j'expliquerai en plus amples détails la maladie de Huntington et les théories sous-jacentes à mon projet d'étude.

## **Maladie de Huntington**

### *Symptômes*

La maladie de Huntington est principalement caractérisée pour ses symptômes moteurs, souvent appelée chorée de Huntington. Dans les formes moins sévères de la maladie, les symptômes se déclarent vers l'âge de 35 ans. Par contre, dans les cas les plus sévères, ils se déclareront avant 18 ans (forme juvénile). L'espérance de vie des personnes atteintes est de

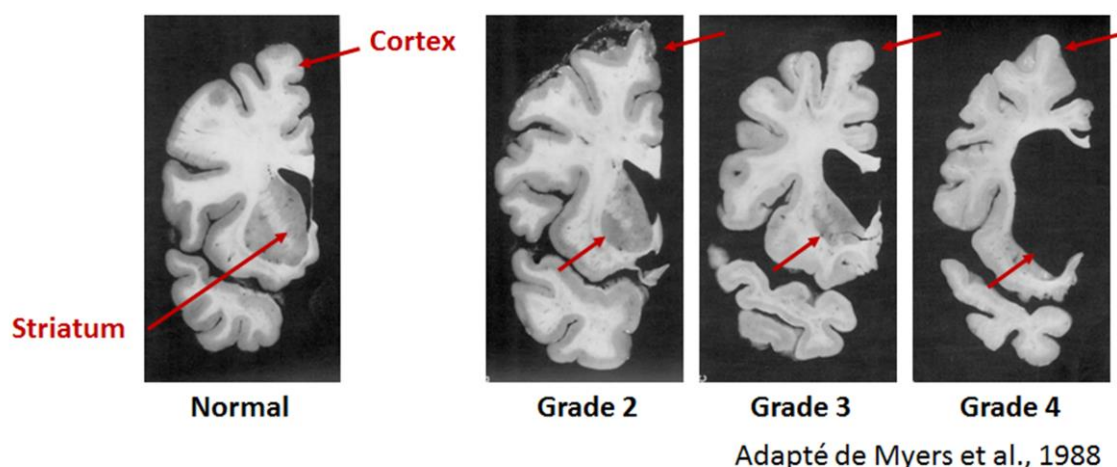
15 à 20 ans suivant l'apparition des symptômes. Bien qu'utile au diagnostic des patients, l'arrivée des symptômes moteurs ne constitue qu'un faible marqueur de la sévérité de la maladie. Lors des stades précoces, la majorité des individus atteints de la maladie présente des mouvements hyperkinétiques (mouvements involontaires) qui sont graduellement remplacés par des mouvements hypokinétiques, tel que de la bradydikinésie et de la rigidité musculaire. Les capacités cognitives se détériorent graduellement affectant la concentration, la mémoire à court terme et les fonctions exécutives pour finalement mener à la démence, la dysphasie (trouble du langage) et des difficultés visuospatiales. En plus des troubles moteurs et cognitifs, les individus atteints de la maladie présentent des troubles émotif et neuropsychiatrique tels que de l'irritabilité, de l'anxiété, de l'apathie et de la dysphorie en plus d'être associé à une haute prévalence de troubles obsessionnels compulsifs, de psychose et de tendance suicidaire (Waldvogel *et al.*, 2012).

Selon une méta-analyse effectuée en 2012, l'incidence de la maladie de Huntington est de 0.40 à 5.7 sur 100 000 par année dépendamment du pays étudié (Pringsheim *et al.*, 2012). Malgré la faible incidence de la maladie comparée à d'autres maladies neurodégénératives, l'impact économique de la maladie est élevé et proportionnel au stade de la maladie, allant de 4150.12\$ US à 24,961.37\$ US par année. Aucun traitement ne s'est avéré efficace contre la progression des symptômes. La majorité de la médication existante cible plutôt les symptômes déjà présents, par exemple, par la prise d'antidépresseur, de neuroleptique et de benzodiazépines (Killoran & Biglan, 2014).

### *Neuropathologie*

Une perte neuronale subvient avec la maladie dans différentes régions cérébrales. Celle-ci se traduit principalement par une atrophie précoce du striatum et l'amincissement progressif du cortex cérébral (Waldvogel *et al.*, 2012, Myers *et al.*, 1988) (**Fig. 1**). Des études ont aussi démontré que l'hippocampe, l'hypothalamus, le thalamus ainsi que le corpus callosum sont aussi affectés dans la maladie de Huntington (Waldvogel *et al.*, 2012). La perte neuronale affecte plus particulièrement les neurones GABAergiques moyens épineux du striatum constituant environ 90 à 95% de la population neuronale de cette région cérébrale expliquant son atrophie précoce (Waldvogel *et al.*, 2012). D'ailleurs le système de classification en 5 catégories (stade 0-4) de Vonsattel, communément utilisé dans la maladie de Huntington, est basé sur histologie macroscopique et microscopique du

striatum (Waldvogel *et al.*, 2012, Vonsattel *et al.*, 1985). Différentes régions cérébrales grandement affectées par la maladie (noyaux caudé, globulus palidus, putamen, noyaux accumbens, etc) sont évaluées selon des critères microscopiques tels que la perte neuronale, la densité neuronale, la présence d'astrocytose et de gliose, le nombre d'oligodendrocyte et selon des critères macroscopiques observés dans les stades plus avancés tels que l'atrophie cérébrale et la couleur du tissu (Vonsattel *et al.*, 1985).



**Figure 1. Neuropathologie de la Maladie de Huntington**

Une atrophie précoce du striatum et un amincissement progressif du cortex cérébral sont observés dans la maladie de Huntington.

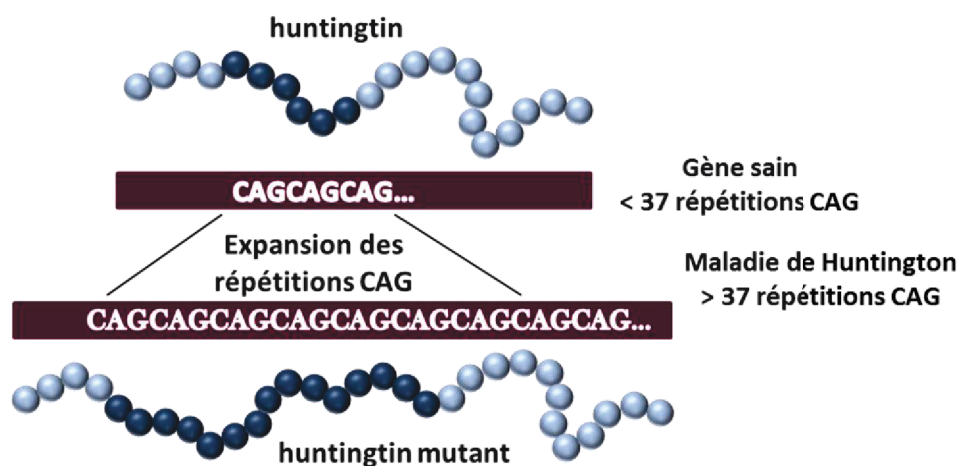
Des études d'imagerie ont reporté que l'atrophie striatale et corticale corrèle avec certains déficits cognitifs tels la mémoire exécutive et l'attention (Montoya *et al.*, 2006). De plus, un amincissement du cortex sensori-moteur est particulièrement remarqué chez les patients souffrant de symptômes choréiformes (Rosas *et al.*, 2008, Rosas *et al.*, 2002).

### ***Mutation et son impact sur la protéine htt***

Cette maladie autosomale dominante est causée par une mutation dans le gène IT15 sur le bras court du chromosome 4 codant pour la protéine huntingtin (htt). Cette protéine de 350 kDa hautement exprimé au niveau neuronale et testiculaire est essentielle au développement de l'organisme et la perte de fonction du gène est létale pour l'embryon (Cattaneo *et al.*, 2005, Nasir *et al.*, 1995). La protéine htt présente une séquence de polyglutamine à son extrémité N-terminale (Cattaneo *et al.*, 2005). Même si les fonctions extra-embryonnaires de htt, tel que dans le placenta, ne requiert pas cette séquence de

polyglutamine, cette région est cruciale pour l'interaction d'htt avec plusieurs de ses partenaires (Cattaneo *et al.*, 2005). Le gène htt muté possède un nombre anormalement long de répétitions CAG (>37 répétitions) allongeant cette séquence de glutamine (**Fig. 2**). La maladie débute en moyenne entre l'âge de 35-44 ans et peut varier en fonction du nombre de répétition CAG: normalement, plus il a de répétition, plus les symptômes se développeront tôt. Une forme juvénile de la maladie est d'ailleurs observée lorsque le nombre de motifs CAG excède 50-60 répétitions (Bordelon, 2013).

Évidemment l'élongation de ces répétitions affecte la conformation de la protéine. Il favorise la création d'un feuillet bêta plutôt que d'une hélice alpha, exposant ainsi des résidus hydrophobes à l'extérieur de la protéine et la prédisposant à former des agrégats. De plus, ce changement de conformation affecte la liaison de la protéine htt avec ces différents partenaires d'interaction, perdant ainsi de l'affinité pour certaines protéines et en gagnant pour d'autre (Arrasate & Finkbeiner, 2012). La protéine htt normale interagit normalement avec divers facteurs ou co-activateur de transcription (p53, NF- $\kappa$ B, CtBP, CA150, CBP) (Steffan *et al.*, 2000, Becanovic *et al.*, 2015, Kegel *et al.*, 2002, Landles & Bates, 2004), des protéines impliquées dans le transport intracellulaire et l'endocytose (HIP1, HIP14, HAP) (Wanker *et al.*, 1997, Huang *et al.*, 2004, Li *et al.*, 1995) et des protéines anti-apoptotiques, tel qu' Akt (Wanker *et al.*, 1997). Ces modifications dans la conformation de htt affectent alors ces fonctions normales telle que le transport vésiculaire et la régulation de la transcription du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), la transmission synaptique via son interaction avec la protein postsynaptic density 95 (PSD-95), la survie cellulaire en empêchant la formation du complexe proapoptotique formé de la « huntingtin interactor protein 1 » et Hippi, en plus de réduire la dégradation de huntingtin (Cattaneo *et al.*, 2005).

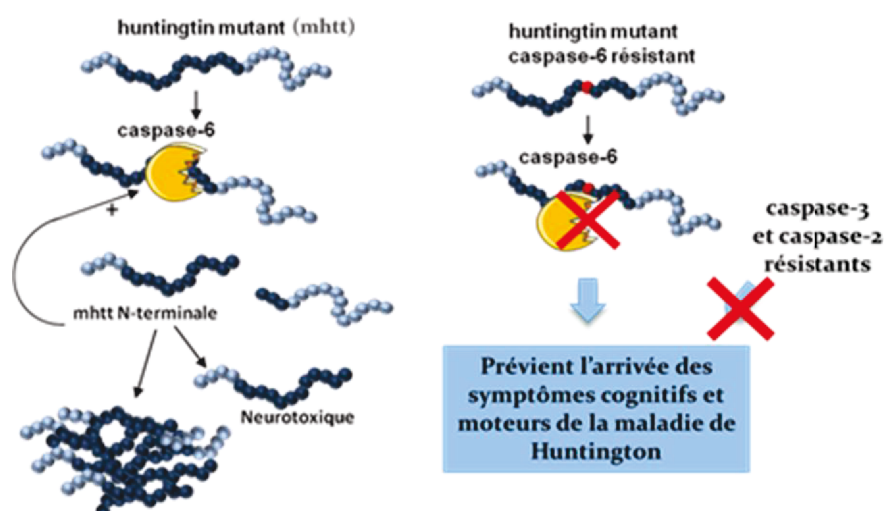


**Figure 2. Mutation à l'origine de la Maladie de Huntington**

Un individu atteint par la maladie d'Huntington aura plus de 37 répétitions CAG dans le gène codant pour la protéine huntingtin créant une séquence de glutamine anormalement longue dans la protéine

#### *Activation des caspases et leurs rôles dans la maladie*

En 2006, Graham et collaborateur ont soulevé l'importance d'une caspase dans le développement de la maladie de Huntington. Les caspases sont des protéases à cystéine clivant divers substrats menant à la mort cellulaire. Plusieurs d'entre elles, tels que les caspases 2, 3 et 6 clivent la protéine htt, tant dans sa forme normale que dans sa forme mutante (Graham *et al.*, 2006, Warby *et al.*, 2008). La prévention du clivage de htt par les caspase-3 et -6 a été analysé dans les YAC128, des modèles murins de la maladie de Huntington, par la mutation de l'aspartate P1 à la position 513 et 552, pour la caspase-3 et à la position 586, pour la caspase-6 (Graham *et al.*, 2006). Les auteurs ont constaté que la prévention du clivage par caspase-6 seulement empêche l'arrivée des symptômes cognitifs et moteurs de la maladie (**Fig. 3**) (Graham *et al.*, 2006).



**Figure 3. Important rôle de caspase-6 dans la maladie de Huntington**

Caspase-6, est surexprimée et suractivée dans les stades précoces de la MH. Elle clive la protéine huntingtin mutante en un fragment neurotoxique. Ce fragment est essentiel au développement de la maladie puisque la mutation d'un résidu dans le site de clivage spécifique à la caspase-6 sur la protéine huntingtin mutante chez un modèle murin de la maladie (YAC128-C6R) prévient l'atrophie striatale ainsi que l'arrivée des symptômes cognitifs et moteurs de la MH.

### *Modèles de la maladie*

Divers modèles de la maladie de Huntington ont été générés dans les deux dernières décennies reproduisant l'histopathologie de la maladie observée chez les patients. Les modèles ont été créés dans diverses espèces incluant le vers (*C. elegans*), mouche à fruit (*D. melanogaster*), cochon, singe, mouton, rat et souris. Cependant, les souris et les rats sont de loin les espèces le plus utilisées pour les modèles de la maladie de Huntington, dû à la facilité d'entretien des colonies, d'analyses comportementales et à leur ressemblance anatomique à l'humain comparé à *C. elegans* et *D. melanogaster* (Pouladi *et al.*, 2013).

### *Modèles murins*

Avant la découverte de la mutation responsable de la maladie de Huntington, les modèles ont été créés à l'aide de l'injection de neurotoxines telles que des agonistes GABAergiques, l'acide ibotenique, l'acide kainique et l'acide quinolinique (McGeer & McGeer, 1976, Schwarcz *et al.*, 1984, Beal *et al.*, 1986). Ces premiers modèles ont permis l'avancement des connaissances sur la maladie de Huntington avant même la découverte de la mutation à l'origine de la maladie, grâce à la reproduction des lésions pathologiques telles



qu'observées chez les humains. Ces techniques, bien qu'essentiellles aux premières découvertes sur la maladie, ont perdu bien de l'intérêt dû à leur rapidité d'induction des lésions (quelques jours ou semaines) comparée au taux de progression des symptômes et des lésions observées dans la maladie (plusieurs décennies) (Pouladi *et al.*, 2013, Ramaswamy *et al.*, 2007).

Suite à la découverte de la mutation dominante dans le gène codant pour htt en 1993, l'utilisation des modèles génétiques est rapidement devenue la norme. Plus de 20 modèles différents existent chez les rongeurs. Tous se distinguent par divers critères, incluant la longueur de la répétition CAG, l'utilisation de la protéine entière ou d'un fragment, la provenance des éléments régulateurs (humain ou endogène à l'animal) et la méthode de production (knock-in ou transgénique) (Pouladi *et al.*, 2013).

Un « knock-in », signifie que le gène muté est inséré dans l'ADN génomique par recombinaison homologe. La synthèse du gène est donc remplacée par celle du gène muté. Dans le cas d'un modèle de type transgénique, le gène ou un fragment du gène est inséré de façon aléatoire dans le génome de l'animal. Dans ce modèle, il y a donc la production de 2 copies de la protéine normale pour une mutée (Menalled, 2005). Bien sûr, chaque modèle possède ses avantages et ses inconvénients. Par exemple, beaucoup de modèles de type « knock-in » ont été réalisés par l'insertion de la séquence de répétitions CAG. Dans ce cas-ci, nous pouvons obtenir une protéine chimère dont certaines parties proviendront de la souris et les autres de la séquence chez l'humain. Cependant, l'insertion de la séquence par recombinaison homologe permet de maintenir une expression protéique plus représentatif de la réalité puisque les éléments régulateurs, même les plus éloignés du gène sont présents. D'un autre côté, chez les souris transgéniques l'expression de la protéine est modifiée puisque nous avons 2 copies normales pour une mutée et les éléments régulateurs éloignés du gène sont absents. Par contre, l'insertion du gène complet avec les éléments régulateurs près du gène permet l'expression de la protéine humaine complète chez la souris sans obtenir de chimère (Lee *et al.*, 2014, Doyle *et al.*, 2012, Maston *et al.*, 2006).

Le modèle utilisé dans ce présent projet est un modèle de souris transgénique exprimant htt mutant (~120 répétitions) humain dans son entier sous le contrôle du promoteur et de ses

éléments régulateurs endogènes contenu sur un chromosome artificiel de levure (YAC). Le souris YAC128 est un modèle bien caractérisé mimant plusieurs aspects neuropathologiques et comportementaux de la maladie de Huntington (Mangiarini *et al.*, 1996, Stack *et al.*, 2005, Slow *et al.*, 2003, Gray *et al.*, 2008). À l'âge de 2 mois, des dysfonctions cognitives commencent à être observées, suivis de trouble psychiatrique et de déficits moteurs progressifs à l'âge de 3 mois. De plus, à l'âge de 4 mois, des déficits précoces de coordination sont observés au rotarod et à 10 mois les souris YAC128 sont plus lents au test du « balance beam » que les souris de type sauvage (Brooks *et al.*, 2012). Comme chez l'humain, ce modèle démontre de l'atrophie cérébrale prédominante au striatum et de la neurodégénérescence (Gil-Mohapel, 2012, Pouladi *et al.*, 2009a, Slow *et al.*, 2003, Van Raamsdonk *et al.*, 2005). Dans le présent projet, le modèle de rongeur sélectionné sont les YAC128 dû à l'expression de la protéine htt mutante humaine entière et pour l'apparition graduelle des symptômes permettant l'analyse de signes précoces de la maladie.

Le modèle HdhQ111 est un modèle knock in contenant une ou deux copies du gène htt en son entier possédant 111 répétitions CAG. Bien que ce modèle montre une certaine instabilité génétique influençant parfois le nombre de répétitions CAG, il possède le domaine proline-riche humain dans son exon 1, une caractéristique importante pour la conformation protéique de htt (Pouladi *et al.*, 2013). Malgré le fait que l'histopathologie et l'arrivée des symptômes sont moins bien caractérisées que les YAC128, un déficit de reconnaissances sociales (14-16 semaines), une diminution de l'apprentissage moteur (6 mois), de l'hypoactivité et une diminution de l'anxiété (10 mois) ainsi que des problèmes de démarches tardifs (24 mois) sont reportés dans la littérature (Holter *et al.*, 2013, Wheeler *et al.*, 2002). Par contre, l'utilisation de lignées cellulaires dérivées de ce modèle permet l'investigation de divers processus cellulaires difficilement analysable *in vivo*.

### *Modèles cellulaires*

Mis à part les modèles cellulaires créés par transfection de htt mutant, très peu de modèles cellulaires spécifiques à la maladie de Huntington ont été créés. La lignée cellulaire STHdhQ111/STHdhQ7 (ou STHdhQ111/STHdhQ<sup>+</sup>) et ces dérivés homozygotes (STHdhQ111/STHdhQ111 et STHdhQ7/STHdhQ7) sont les seuls modèles cellulaires immortalisés à ce jour dédié à cette maladie. Ces lignées ont été extraites de la primordia

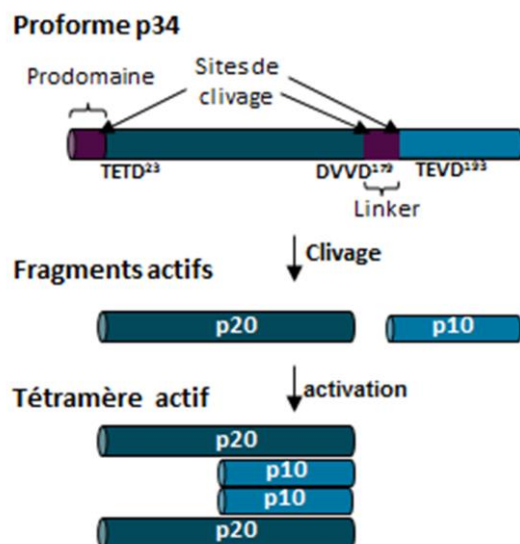
striatale d'embryons E14 HdhQ111/HdhQ7, HdhQ111/HdhQ111 ou HdhQ7/HdhQ7 respectivement. Les cellules, une fois extraites, ont été infectées avec le large antigène T SV40 rétroviral contenant la mutation tsA58/U19 permettant la croissance des cellules à 33°C et l'immortalisation des cellules (Trettel *et al.*, 2000). Le maintien de l'antigène est assuré par l'ajout constant d'un agent de sélection, soit la généticine (G418). Selon les besoins, une fois le nombre de cellules requis atteint, la température peut être augmentée à 39°C afin d'empêcher la production de l'oncogène (Cattaneo & Conti, 1998).

Ces cellules récapitulent certaines caractéristiques de la maladie chez l'humain ou les modèles murins. Par exemple, elles démontrent des altérations du métabolisme énergétique, des altérations dans l'activité du récepteur NMDA et des voies sous-jacentes et un ralentissement du cycle cellulaire (Gines, Ivanova, *et al.*, 2003, Saavedra *et al.*, 2010, Gines, Seong, *et al.*, 2003). Les cellules HdhQ7 et HdhQ111 seront d'une importance cruciale dans ce projet puisqu'elles serviront à étudier en plus amples détails les mécanismes de mort cellulaire et d'excitotoxicité, informations qui peuvent être difficiles à étudier dans des modèles murins ou chez l'humain. Dans la section suivante, j'expliquerai le processus de mort cellulaire programmé, ou apoptose, qui sera à l'étude dans ce projet.

### **Apoptose**

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus cellulaire essentielle à l'homéostasie tissulaire : un taux anormalement haut mènera à des phénomènes tels que la neurodégénérescence alors qu'un taux anormalement bas mènera par exemple à l'apparition de tumeurs (Fulda, 2013). Ce processus est entre autres orchestré par une famille d'enzyme appelée caspase. Cette famille de protéases à cystéine contient au moins 11 membres chez l'humain et leur principale fonction est de cliver divers substrats menant à la mort cellulaire (McLuskey & Mottram, 2015). Il existe 2 types de caspases : les initiatrices (caspases 2, 8, 9 et 10) soit les premières caspases activées dans la cascade apoptotique activant les autres caspases et les exécutrices (caspases 3, 6 et 7), qui clivent une multitude de substrats perturbant la viabilité cellulaire. Cette famille d'enzyme est d'abord produite sous leur forme inactive appelée proforme ou zymogène. Elles sont activées lors de leur clivage, processus dans lequel le prodomaine de la caspase est enlevé, puis la caspase est clivée en 2

sous unités actives (longue et courte) qui s'assembleront pour former le complexe actif (**Fig.4**) (McIlwain *et al.*, 2015).



**Figure 4. Activation des caspases.**

Les caspases sont activées par le clivage de leur prodomaine et la génération de 2 sous-unités actives (une longue, p20 et l'autre petite, p10). Les sous-unités actives s'assemblent alors pour former un tétramère actif. Dans cette figure, un exemple de l'activation de la caspase-6 est présenté. \*Adapté de Riechers *et al.*, 2016.

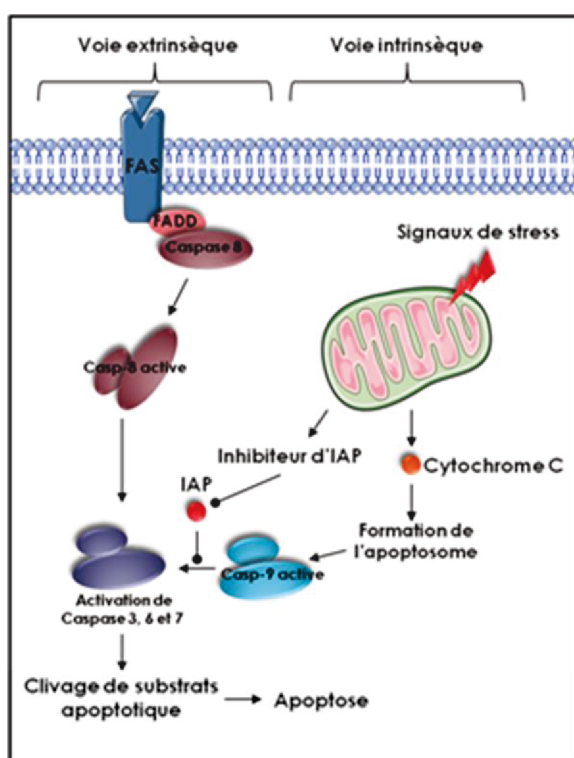
#### *Voie extrinsèque*

Il existe 2 voies apoptotiques : la voie extrinsèque et intrinsèque. La voie extrinsèque, comme son nom l'indique, est activée par un facteur extérieur à la cellule. Le signal externe est transmis à l'intérieur de la cellule par un récepteur situé à la membrane plasmique. Il existe différents récepteurs transmettant les signaux apoptotiques tels que le récepteur de mort cellulaire Fas/CD95. Selon le récepteur, différents complexes peuvent s'activer et mener à l'activation de caspases initiateuses qui transmettront le signal apoptotique par l'activation des différentes caspases exécutrices (**Fig.4**) (McIlwain *et al.*, 2015).

#### *Voie intrinsèque*

Différentes familles de protéine, comme les caspases, régulent l'homéostasie entre la mort et la survie cellulaire. La famille des homologues B-cell lymphoma 2 ou Bcl2, en est un exemple. Cette famille est divisée en homologue pro- et anti-apoptotique (Kirkin *et al.*, 2004). Les homologues Bcl-2 pro-apoptotique favorisent la formation de pores mitochondriaux libérant divers facteurs proapoptotiques tels que le cytochrome c et des

inhibiteurs d'IAP (Inhibiteur de l'apoptose), alors que les homologues anti-apoptotiques empêchent la formation de ces pores. Lorsqu'une anomalie cellulaire est détectée, l'équilibre entre les homologues pro- et anti-apoptotique est modifié. L'expression des différents homologues est modifiée en faveur des activateurs et si la perturbation est assez forte, les facteurs mitochondriaux sont alors relâchés. Le cytochrome c et l'APAF-1, deux molécules essentielles à la formation de l'apoptosome, sont libérées et s'associent avec la caspase-9. L'apoptosome ainsi formé peut alors activer la caspase-9 et enclenchera une cascade proapoptotique en activant les caspases exécutrices (**Fig. 5**) (McIlwain *et al.*, 2015).



**Figure 5. Voies de signalisation apoptotiques**

Il existe deux types de voies proapoptotiques, la voie intrinsèque et celle extrinsèque. La voie intrinsèque se réfère à tout changement détecté à l'intérieur de la cellule relâchant des inhibiteurs d'inhibiteurs de protéase (Inhibiteur d'IAP) et modifiant la balance des homologues Bcl-2 vers les homologues proapoptotiques et ultimement, la mort cellulaire. La voie extrinsèque se réfère plutôt à tous changements externes à la cellule détectée par un récepteur qui transmet le signal à l'intérieur de la cellule et qui déclenche une cascade apoptotique impliquant l'activation des caspases.

### ***Caspases dans la maladie de Huntington et le vieillissement***

Une augmentation de la relâche de cytochrome c et de l'activité de la caspase-3 a été détectée dans l'hippocampe de rats âgés de 22 mois comparés aux rats de 4 mois (Lynch & Lynch, 2002). Dans le foie, une augmentation de l'activité de caspase -2, -6, -7 et -9 est aussi constatée avec l'âge chez le rat (Zhang *et al.*, 2003) et une augmentation de l'Expression de l'ARNm des caspases 8 et 3 est constaté chez l'humain dans les lymphocytes T des individus âgés (Zhang *et al.*, 2003). Par contre, cette relation n'est pas aussi claire à travers les divers systèmes de l'organisme. Par exemple, dans le colon une diminution de l'activité des caspase-3, -8 et -9 est constaté avec l'âge chez le rat.

L'analyse histologique de cerveau d'individus atteints de la maladie de Huntington et d'un modèle de la maladie (YAC72) a démontré une augmentation de l'expression des caspase-2, -6 et -7 dans le striatum en immunohistochimie (Hermel *et al.*, 2004). Comme expliqué précédemment, htt est clivé par diverses caspases, tels que les caspases 2, 3 et 6, et l'accumulation de fragments N-terminals de htt est observé dans les tissus cérébraux post-mortem de sujet atteints de la maladie et des modèles de la maladie de Huntington, tel que les souris YAC72 (Graham *et al.*, 2011b). Par contre, la production du fragment N-terminal produit par la caspase-6 est nécessaire au développement de la maladie (Hermel *et al.*, 2004, Graham *et al.*, 2010, Pouladi *et al.*, 2009b, Graham *et al.*, 2006).

### **Découverte de nouveaux partenaires d'interaction de caspase 6**

Le clivage de la protéine htt mutante par la caspase-6 est un événement essentiel au développement de la maladie de Huntington (Graham *et al.*, 2006). De plus, la prévention du clivage de htt, dans la MH, de protéine précurseur de l'amyloide- $\beta$  par la caspase-6 dans la maladie d'Alzheimer ou de la délétion de caspase-6 s'est avérée bénéfique dans plusieurs études suggérant un rôle pour cette caspase dans la neurodégénérescence (Riechers *et al.*, 2016a). Étant donné l'importance du clivage de l'amyloide- $\beta$  et de htt dans la maladie d'Alzheimer et la maladie de Huntington respectivement, caspase-6 semblerait jouer un rôle dans les processus de dégénérescence (Graham *et al.*, 2011b). Malgré son implication dans le développement de ces maladies, peu d'études ont été réalisées sur l'interactome de caspase-6, informations importantes afin de comprendre comment caspase-6 mène à la dégénération axonale, au dysfonctionnement neuronal et à la mort cellulaire dans ces maladies (Riechers *et al.*, 2016a).

### ***Identification de substrats potentiels***

Afin de caractériser l'interactome de caspase-6, Riechers et collaborateur ont effectué un double hybride en levure (Y2H) (Riechers *et al.*, 2016a). Le principe du Y2H consiste en la détection de l'interaction chez la levure entre une protéine nommée appât et une autre appelée proie. L'appât est fusionné à un domaine de liaison à l'ADN alors que la proie est fusionnée avec un domaine d'activation de la transcription. Lorsqu'il y a interaction entre les deux protéines, la reconstitution du domaine de liaison à l'ADN et le domaine d'activation de la transcription permet la transcription d'un gène rapporteur permettant la croissance de la colonie sur un milieu sélectif ou l'identification de la colonie par la production d'un pigment (Bruckner *et al.*, 2009). Différentes protéines de fusion ont été produites contenant un domaine de liaison à l'ADN et une des 3 formes de la caspase-6, soit la proforme (p34), la grande sous unité active (p20) et la petite sous-unité active (p10). La librairie de proies, contenant l'activateur de la transcription GAL4, a été produite à l'aide d'une banque de 16 945 cDNA de cerveau humain (Riechers *et al.*, 2016a). Lorsqu'il y a interaction entre une des caspase-6 recombinantes et la proie, la croissance de la levure sera permise sur les géloses sélectives ne possédant pas de leucine, tryptophane, histidine et d'adénine et la production de la galactosidase donnera un pigment bleu à la colonie (Riechers *et al.*, 2016a).

Le Y2H a été fait en triplicata et 87 partenaires d'interaction sont sortis positifs à chacun des 3 essais. Les protéines contenant au moins un site de clivage ont été identifiées à l'aide du logiciel SitePrediction. La liste des substrats potentiels trouvés (53/87) a été ensuite raffinée en incluant seulement les gènes exprimés dans le cerveau humain dont l'expression est altérée dans la maladie de Huntington (32/87) et dont la forme protéique interagit autant avec les deux sous unités actives de la caspase-6 (21/87). Les candidats ont été sélectionnés selon leur implication dans les phénomènes d'excitotoxicité et/ou de l'apoptose. Parmi les candidats potentiels sélectionnés dans l'article de Riechers et collaborateurs (9/87), nous retrouvons entre autres, les protéines death domain associated protein (DAXX) et la sérine thréonine kinase 3 (STK3) (Riechers *et al.*, 2016a). Nous avons sélectionné ces deux derniers pour leur relation avec la maladie d'Alzheimer et le vieillissement ainsi que pour

leurs nombreuses interactions avec des protéines déjà impliquées dans la maladie de Huntington.

### **Daxx**

La protéine Death-associated protein 6, aussi appelé Daxx, est une protéine ubiquitaire impliquée dans divers processus cellulaires tels l'apoptose, la tumorigénèse, le développement et la transcription (Perlman *et al.*, 2001, Roubille *et al.*, 2007, Saeed *et al.*, 2009, Salomoni *et al.*, 2006, Salomoni & Khelifi, 2006, Su *et al.*, 2007, Tang *et al.*, 2013, Torii *et al.*, 1999, Wu *et al.*, 2002, Zhao *et al.*, 2004, Zabalova *et al.*, 2008). Les fonctions de Daxx sont cependant ambiguës puisque plusieurs résultats contradictoires concernant ses fonctions dans l'apoptose sous l'influence de différents stress cellulaires sont rapportés dans la littérature.

### ***Voies de signalisation et fonctions cellulaires***

#### ***Localisation intracellulaire***

Bien que DAXX ait d'abord été identifiée comme une protéine nucléaire, plus normalement localisée aux corps nucléaires PML (promyelocytic leukemia) et sa translocation du noyau vers le cytosol a été démontrée ou elle activerait la voie de Jun N-terminal kinase (JNK) (Song & Lee, 2003). Sa localisation cellulaire est un facteur crucial influençant cette interaction et la translocation de DAXX est affectée par différents facteurs tels, les modifications post-traductionnelles, le type cellulaire, divers états de stress cellulaire ainsi que le cycle cellulaire (translocation vers l'hétérochromatine en phase S) (Salomoni & Khelifi, 2006). Par exemple, un effet différentiel sur la localisation de DAXX a été obtenu dans diverses lignées cellulaires ayant été exposées *in vitro* à différents stress cellulaires, tels le stress oxydatif, l'amyloïde- $\beta$ , l'hypoxie chimique, les rayons UV, les lipoprotéines de faible densité (LDL) oxydées ou la déprivation de glucose (Niu *et al.*, 2011, Zabalova *et al.*, 2008, Lindsay *et al.*, 2009, Khelifi *et al.*, 2005, Nefkens *et al.*, 2003, Ma & Devarajan, 2008, Akterin *et al.*, 2006a, Waak *et al.*, 2009, Jung *et al.*, 2007, Xiong *et al.*, 2014, Wu *et al.*, 2002). La localisation de DAXX aux noyaux peut aussi varier selon le cycle cellulaire. Par exemple, la présence de DAXX a été décrite au nucléole, aux corps nucléaires PML ou au centromère pendant l'interphase ou à l'hétérochromatine pendant la phase S du cycle cellulaire.



### *Fonctions*

Daxx a originellement été identifiée comme un partenaire d'interaction du récepteur proapoptotique Fas/CD95 (Yang *et al.*, 1997, Lindsay *et al.*, 2009, Torii *et al.*, 1999). Étant une protéine ayant une localisation majoritairement nucléaire, l'interaction entre DAXX et Fas requiert une translocation de DAXX du noyau vers le cytosol souvent associé à l'activation de la voie de signalisation de Jun-N-terminale kinase (JNK) (Song & Lee, 2003). Au cytosol, lorsque le récepteur Fas/CD95 est actif, DAXX semble interagir avec ASK1 et active à son tour la voie de JNK (Song & Lee, 2003). De plus, normalement DAXX, localisée aux corps nucléaires PML, interagit avec un complexe comprenant Mouse double minute 2 homolog (mdm2) et la Tumor protein p53 (p53) favorisant l'activité de mdm2 menant ainsi la dégradation de p53 et la survie cellulaire. Par contre, lors de la translocation de DAXX des corps nucléaires PML au cytoplasme, p53 est relâché des corps nucléaires PML permettant l'augmentation de la transcription de gènes proapoptotiques (Jung *et al.*, 2007). DAXX peut aussi interagir indirectement avec p53 via la formation d'un complexe avec l'axin, un régulateur négatif de la voie pro-proliférative WNT/Beta-caténine, et Homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) lors de stress cellulaire stimulant ainsi la phosphorylation de p53, la transcription de gènes proapoptotiques et la relâche du cytochrome c menant ainsi à l'apoptose (**Fig. 6**) (Li *et al.*, 2007).

Daxx, qui est démontrée pour interagir avec une variété de facteurs de transcription, peut aussi agir comme un co-activateur ou un co-répresseur de la transcription. En recrutant l'histone désacétylase 1 (HDAC1) ou l'ADN méthyltransférase 1 il peut agir comme répresseur de transcription et lorsqu'il recrute CREB-binding protein (CBP) qui possède une activité histone acetyltransferase, il peut agir comme coactivateur de transcription (Emelyanov *et al.*, 2002). Il a d'ailleurs été démontré que DAXX diminue la transcription du gène p21 par le facteur de transcription p53 et augmente la transcription de la glutamate décarboxylase (GAD67), un enzyme impliqué dans la synthèse du neurotransmetteur acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) (Gostissa *et al.*, 2004, Subburaju *et al.*, 2016). Les fonctions de DAXX sur la transcription n'est permise que lorsque DAXX est libéré des corps nucléaires PML et transloque à l'hétérochromatine lors de la phase S (Lindsay *et al.*, 2008, Ecsedy *et al.*, 2003). Durant l'interphase, DAXX peut interagir avec MSP58 ce qui promeut son

accumulation au nucléole et inhibe son effet sur la transcription (Lindsay *et al.*, 2008, Lin & Shih, 2002). De plus, il a été démontré que DAXX peut aussi interagir avec CENP-C au centromère durant l'interphase, interaction qui pourrait contrôler les fonctions proapoptotiques de DAXX (Pluta *et al.*, 1998).

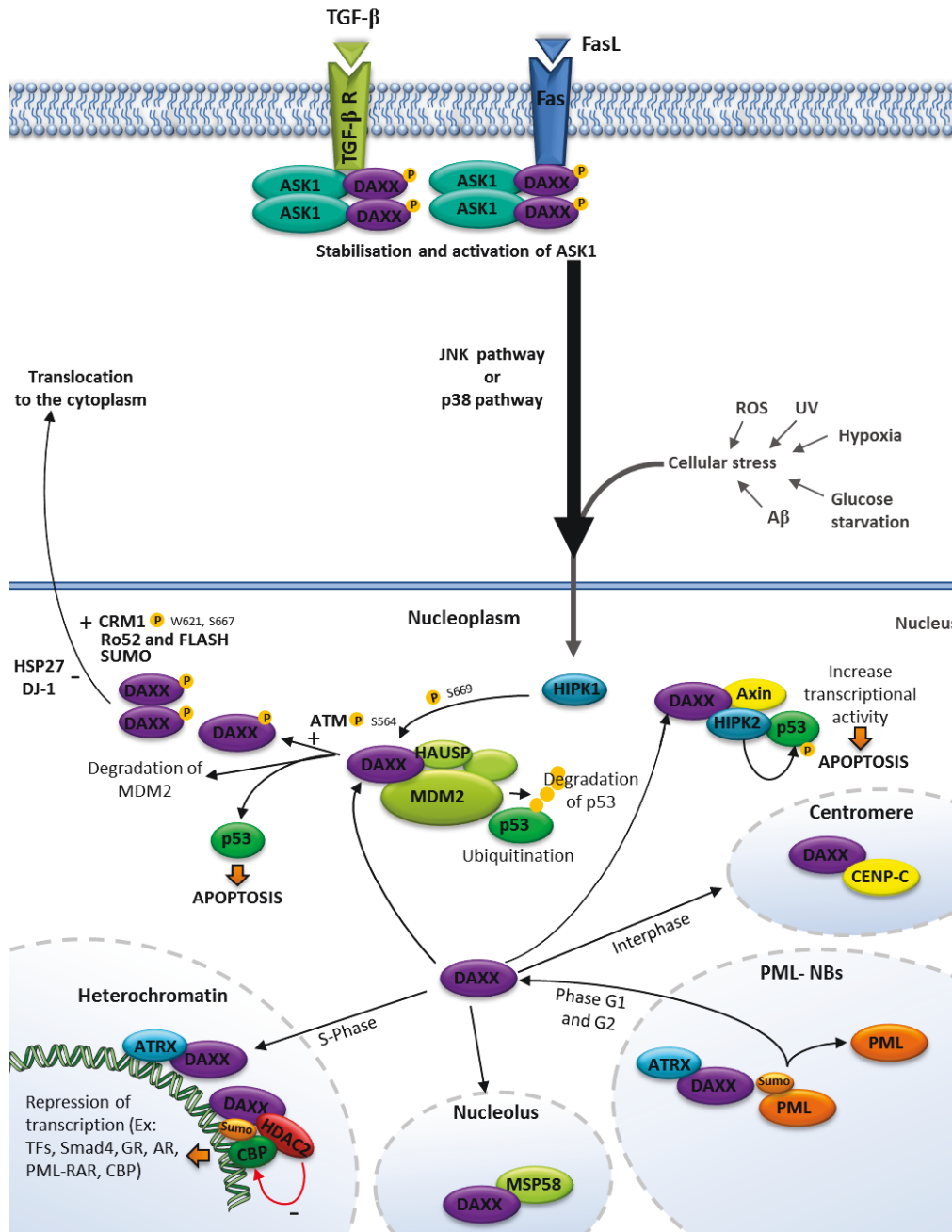
### *Modifications post-traductionnelles*

DAXX est hautement régulé par des modifications post-traductionnelles, incluant la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation (**Fig. 6**). La sérine-thréonine kinase Ataxia telangiectasia mutated (ATM) phosphoryle DAXX sur la S564, ce qui diminue l'interaction de DAXX avec mdm2, menant ainsi à l'accumulation de p53 (Tang *et al.*, 2013). La phosphorylation de DAXX par la sérine-thréonine kinase ASK1 sur la S176 et S184 favorise l'ubiquitination de DAXX sur la K122 et mène à l'augmentation des niveaux protéiques de DAXX (Fukuyo *et al.*, 2009). L' Homeodomain-interacting protein kinase 1 (HIPK1), une kinase activée par la voie de JNK suite à l'activation du récepteur Fas/CD95, phosphoryle aussi DAXX et favorise sa relocalisation des corps nucléaires PML à la chromatine (Ecsedy *et al.*, 2003). De façon similaire, HIPK2 favorise la relocalisation de DAXX des PML-NBs au nucléoplasme (Ecsedy *et al.*, 2003, Hofmann *et al.*, 2003). Comme les fonctions proapoptotiques de DAXX sont étroitement reliées à sa localisation intracellulaire, les modifications post-traductionnelles peuvent aussi influencer la mort cellulaire et les voies de signalisation proapoptotiques. Le poids moléculaire de DAXX est de 81 kDa. Par contre, lors de la migration sur gel SDS-PAGE, plusieurs bandes inférieures et supérieures au poids moléculaire théorique de DAXX peuvent être obtenues. Les nombreuses modifications post-traductionnelles (phosphorylation, ubiquitination et sumoylation) sur DAXX expliquent la présence de diverses formes de DAXX observées sur gel SDS-PAGE possédant un poids moléculaire supérieur à 81 kDa (Hollenbach *et al.*, 1999).

### *Protéolyse*

Mis à part, la phosphorylation et l'ubiquitination de DAXX, le clivage de DAXX pourrait lui aussi participer à la régulation des fonctions de DAXX. (Hollenbach *et al.*, 2002, Hollenbach *et al.*, 1999, Lalioti *et al.*, 2002, Lalioti *et al.*, 2009, Michaelson *et al.*, 1999, Michaelson & Leder, 2003, Pineiro *et al.*, 2012b, Wu *et al.*, 2002). À ce jour, une seule

protéase virale est connue pour cliver DAXX. Malgré le peu d'information en la matière, l'investigation de la littérature nous a permis de détecter certains fragments de DAXX (~50, 60, 70 kDa) en immunobuvardage de quelques lignées cellulaires et tissus, fragments qui n'ont pas fait l'objet de plus ample investigation dans les articles en question. (Hollenbach *et al.*, 2002, Hollenbach *et al.*, 1999, Lalioti *et al.*, 2002, Lalioti *et al.*, 2009, Michaelson *et al.*, 1999, Michaelson & Leder, 2003, Pineiro *et al.*, 2012b, Wu *et al.*, 2002). Peu d'immunobuvardage dans la littérature présentent des fragments de DAXX puisque la majorité de ceux-ci sont coupés afin de montrer uniquement la forme entière et/ou la forme hyperphosphorylée. Malgré l'existence de ces fragments, peu d'intérêt leurs ont été accordés et à leurs possibles fonctions dans l'apoptose. Il serait d'autant plus important d'investiguer les fonctions de ces fragments puisque l'étude de différents mutants de délétion de DAXX leur suggère un rôle dans l'apoptose. Dans cette étude, la transfection de ces différents mutants de délétion a démontré un effet différentiel de ceux-ci sur l'apoptose dans différentes lignées cellulaires (HeLa, HEK293 and L929) (Yang *et al.*, 1997). De plus, des effets proapoptotiques ont particulièrement été attribués à des mutants de délétion spécifiques de DAXX (DAXX 501-625 et DAXX C501). Le mutant C-terminal 501-625 de DAXX est d'ailleurs utilisé comme une forme dominante négative de DAXX (Song & Lee, 2004b, Yang *et al.*, 1997).



**Figure 6. Voie de signalisation de DAXX.** DAXX est phosphorylé par Homeodomain Interacting Protein Kinase 1 (HIPK1) lors de plusieurs stress cellulaires tels que le traitement aux rayons UV, à l'amyloïde  $\beta$ , la déprivation de glucose, l'hypoxie et la présence de radicaux libres (ROS). Cette phosphorylation mène à la relâche de Mouse double minute 2 homolog (Mdm2), interaction souvent observée aux corps nucléaires PML, causant sa dégradation, l'accumulation de Tumor protein p53 (p53) et la mort cellulaire. La phosphorylation par Ataxia telangiectasia mutated (ATM) mène aussi à la relâche de p53. DAXX peut aussi être relocalisée au nucléole, aux corps nucléaires PML ou au centromère pendant l'interphase ou à l'hétérochromatine pendant la phase S du cycle cellulaire. DAXX

peut aussi transloquer au cytoplasme suite à sa phosphorylation par CRM1. Cette translocation peut être favorisée par l'interaction avec SUMO, Ro52 et FLASH.

### ***Implication dans la neurodégénérescence***

Plusieurs articles impliquent les ROS et les stress oxydatifs comme une des causes principales de plusieurs maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer, de Huntington et de Parkinson ainsi que du vieillissement en général. Par exemple, l'amyloïde  $\beta$ , fragment généré par le clivage de la protéine précurseur de l'Amyloïde  $\beta$  par la  $\beta$ -sécrétase puis par la  $\gamma$ -sécrétase formant les plaques amyloïdes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer produirait des stress oxydatifs dans la cellule (Butterfield *et al.*, 2013). Ces stress oxydant les cystéines de la Thioredoxin (TRX) et de la Glutaredoxin (GRX) en pont disulfure, ce qui lèverait l'inhibition que ces deux protéines ont sur ASK1. ASK1 ainsi actif peut alors activer la voie des MAP kinases associées à JNK menant à l'activation de HIPK. HIPK phosphoryle alors Daxx provoquant sa translocation au cytoplasme (Akterin *et al.*, 2006b).

Ce mécanisme a aussi été observé dans les modèles murins de la maladie de Parkinson dans lesquels l'administration de 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), une toxine provoquant des symptômes de la maladie de Parkinson, provoquerait l'oxydation de la TRX et de la GRX (Karunakaran *et al.*, 2007). De plus, une relocalisation de Daxx au cytoplasme et une augmentation de l'activité de JNK ont aussi été observées lors de l'induction d'une ischémie transitoire chez la souris et l'injection d'un vecteur l'antiviral contenant la protéine htt mutante une augmente l'activité de JNK chez les rats démontrant l'implication de JNK dans l'ischémie transitoire et la maladie de Huntington (Akterin *et al.*, 2006b).

Dans la maladie de Huntington, des analyses de microarray ont permis de détecter une augmentation de l'ARNm de DAXX dans le cerveau de patients atteint de cette maladie (Riechers *et al.*, 2016a). Il est aussi à noter que DAXX a pour partenaire d'interaction certaines protéines impliquées dans la maladie de Huntington, tel CREB-binding protein (Kuo *et al.*, 2005, Giralt *et al.*, 2012). De plus, DAXX est clivé par la caspase-6, une protéase clé dans la maladie de Huntington (Riechers *et al.*, 2016a).

## STK3

### *Voies de signalisation*

La Sérine/thréonine kinase 3 (STK3 ou MST2) est une protéine exprimée entre autres dans les reins, le placenta, le cœur, les poumons et les tissus cérébraux. Elle fait partie du «germinal center kinase group II», de la famille des MAPK, qui est localisée dans le cytoplasme et au noyau (Creasy & Chernoff, 1995). Elle possède un domaine kinase en N-terminale de la protéine et un domaine SARAH en C-terminale participant à l'homodimérisation de la protéine (Song *et al.*, 2015). La voie de STK3 réfère très souvent à la voie de Hippo, son orthologue chez la drosophile qui a été plus amplement caractérisée. La table suivante représente les composantes de la voie Hippo chez la drosophile et ses orthologues chez l'humain (**Table 1**) (Liu, Wong, *et al.*, 2012). En réponse à des stress cellulaires, STK3 s'active par dimérisation et trans (ou auto) phosphorylation. Les MST phosphorylent alors MOB1A/B et LATS1/2 activant ainsi LATS 1 /2 (O'Neill *et al.*, 2005). LATS 1 /2 alors actif phosphoryle YAP provoquant sa rétention au cytosol et empêche ce dernier de lier l'activateur de transcription Scalloped/TEAD qui promeut normalement la prolifération cellulaire (Qin *et al.*, 2013). De plus, STK3 phosphoryle les facteurs de transcription FOXO favorisant la transcription de gènes proapoptotiques.

Composante de la voie chez <i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i>	Orthologue chez les mammifères	Fonctions
<b>Hippo</b>	Sterile 20-like kinase 1 et 2 (MST1 et MST2)	Kinase (Phosphorylation de LATS1 et MOB1)
<b>Warts</b>	Large tumor suppressor 1 et 2 (LATS1 et LATS2)	Kinase (Phosphorylation de YAP)
<b>Mats</b>	Mps Once Binder kinase activator-like 1 (MOB1)	Kinase ; liaison protéique augmente l'activité des LATS
<b>Sav</b>	SAV1 ou WW45	Protéine d'échaffaudage; augmente l'activité des LATS
<b>Yorkie</b>	Yes-associated protein (YAP) et TAZ(un paraglogue de YAP, aussi connu comme WWTR1)	Régulateur transcriptionnel (transcription de gènes augmentant la prolifération cellulaire)
<b>Fat (Ft)</b>	Tumor suppressor homolog 4 (FAT4)	Cadhérine atypique ; possible récepteur activant la voie Hippo
<b>Merlin</b>	Neurofibromin 2 (NF2)	Protéine d'échaffaudage; En synergie avec KIBRA, induit la phosphorylation des LATS.
<b>KIBRA</b>	KIBRA	En synergie avec NF2, induit la phosphorylation des LATS.

**Table 1. Composantes de la voie Hippo chez la drosophile et les mammifères.**

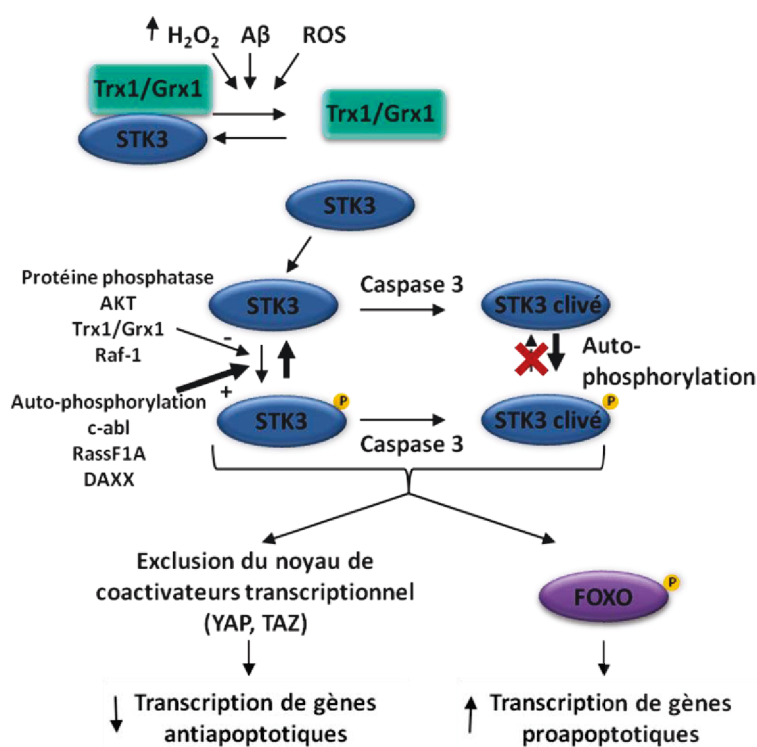
#### *Modifications post-traductionnelles*

Tel que mentionné plus tôt, STK3 peut s'autophosphoryler sur la T180 menant ainsi à son activation. Par contre, la T180 peut être déphosphorylée par des protéines phosphatases 1 et 2A, ce qui inactive STK3 (**Fig. 7**) (Deng *et al.*, 2003a). Notamment, Raf-1 interagit avec STK3 et recrute des phosphatases tel que la PP2A menant ainsi à l'inactivation de STK3 (O'Neill & Kolch, 2005). STK3 est aussi phosphorylée par c-abl sur la tyrosine Y81, ce qui réduit l'interaction entre Raf-1 réduisant ainsi l'inhibition de Raf-1 sur STK3 (Liu, Wu, *et al.*, 2012). Il semblerait aussi que STK3 posséderait des sites de phosphorylation

inhibitrices (T117 et T384) et la déphosphorylation de ces sites activerait STK3 (Kim *et al.*, 2010).

### Protéolyse

STK3 est depuis longtemps reconnu comme un substrat de la caspase-3 (Lee *et al.*, 1998). Par contre, ce n'est que tout récemment que STK3 a été identifié comme un substrat de la caspase-6 (Riechers *et al.*, 2016a). Tel que mentionné plus tôt, l'activité de la forme native de STK3 dépend de l'autophosphorylation du résidu T180. Elle peut alors être inactivée par des protéines phosphatases. Par contre, la forme tronquée de STK3 est résistante à cette inactivation.



### Figure 7. Rôle proapoptotique de la Sérine/Thréonine kinase 3 (STK3).

Lors de stress cellulaire, la glutaredoxine (Grx1) et la thioredoxine (Trx1) se dissocient de STK3 ce qui promeut son activation par sa dimérisation et son autophosphorylation. Une fois activé, STK3 promeut l'apoptose augmentant la transcription de gènes proapoptotiques et en diminuant la transcription de gènes anti-apoptotique. L'activité de STK3 est régulée par les protéines phosphatases (PP1 et PP2A) qui l'inactivent et par son clivage par la caspase-3 en un fragment constitutivement actif de 34 kDa.



### ***Implication dans la mort cellulaire et la neurodégénérescence***

En présence d'amyloïde  $\beta$ , fortement impliqué dans la maladie d'Alzheimer, il y a une diminution de la phosphorylation de FOXO3 par Akt et augmentation de la phosphorylation par MST1, un homologue de STK3, menant à l'accumulation de FOXO3a au noyau et la transcription de plusieurs gènes proapoptotiques tels FASL et TRAIL (Sanphui & Biswas, 2013). De plus, thioredoxin-1(Trx1) interagit avec MST1 empêchant ainsi son activation. Cependant, en présence de peroxyde d'hydrogène, l'interaction est rompue permettant ainsi l'homodimerisation de STK3 et son activation (Chae *et al.*, 2012). De plus, il a été démontré que Trx1 se retrouve oxydé en présence d'amyloïde- $\beta$  brisant ainsi son interaction avec ASK1, un autre membre de la famille des MAPK, menant à son activation (Akterin *et al.*, 2006b). Donc, Trx1 ainsi oxydé en présence d'amyloïde  $\beta$ , STK3 serait alors libéré de l'inhibition de Trx1 et pourrait alors s'activer. STK3 est phosphorylé par c-Abl qui est lui-même activé par le stress oxydatif produit par l'amyloïde  $\beta$ . Cette phosphorylation jouerait un rôle critique dans la mort cellulaire neuronale induite par la roténone, un inhibiteur du complexe 1 mitochondriale (Liu, Wu, *et al.*, 2012). Cette phosphorylation sur tyrosine de STK3 pourrait, comme son homologue, Mst1, augmenter la liaison et l'activation du facteur de transcription FOXO3 menant à la transcription de plusieurs gènes proapoptotiques (Qin *et al.*, 2013). De plus, dans la maladie de Huntington, des analyses de microarray ont permis de détecter une augmentation de l'ARNm de STK3 dans le cerveau de patients atteint de cette maladie (Riechers *et al.*, 2016a).

## HYPOTHÈSE/PROBLÉMATIQUE

La caspase-6 est impliquée dans diverses maladies neurodégénératives. Son expression et/ou son activité sont dérégulées dans le vieillissement, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Huntington. Elle est impliquée dans la dégénération axonale et le clivage d'APP et de la protéine Tau, tous les deux fortement reliés à la maladie d'Alzheimer. Cette caspase est aussi un joueur majeur dans la neurodégénérescence précoce associé à la maladie de Huntington puisque son activation est observée avant l'apparition des symptômes chez l'humain et les modèles murins de la maladie. De plus, le clivage de la protéine htt mutant par la caspase-6 produit un fragment N-terminal neurotoxique essentiel au développement des symptômes de la maladie. Une étude précédente a été réalisée afin de caractériser l'interactome de cette caspase et a permis de révéler l'interaction et le clivage de la Serine/Threonine Kinase 3 (STK3) et de la Death-domain associated protein 6 (DAXX) par la caspase-6. Nous avons alors émis l'hypothèse que STK3 et DAXX jouent un rôle dans l'apoptose des cellules neuronales observé lors du vieillissement et de la maladie de Huntington. Afin de vérifier cette hypothèse, les objectifs de ce présent projet sont les suivants :

- **Objectif 1 :** Caractériser l'expression de DAXX et STK3 dans les processus du vieillissement dans les organes périphériques et les régions cérébrales murins.
- **Objectif 2 :** Déterminer si l'expression de DAXX et STK3 est altérée dans la maladie de Huntington.
- **Objectif 3 :** Déterminer le rôle de DAXX et de STK3 dans la mort cellulaire chez un modèle cellulaire de la maladie de Huntington suite à l'induction de stress cellulaires.

## ARTICLE 1

### **Differential expression of the caspase substrate death-associated protein 6 with aging in peripheral organs and brain regions**

**Auteurs de l'article:** Mélissa Lessard-Beaudoin, Mélissa Laroche, Marie-Josée Demers, Catherine Duclos, Jean-Bernard Denault, Guillaume Grenier, Sean-Patrick Riechers, Erich E. Wanker and Rona K. Graham

**Statut de l'article:** Publié dans Biogerontology

**Avant-propos:** Le travail expérimental sous-jacent à cet article a été entièrement effectué par moi-même à l'exception de la quantification de l'ARNm dans les régions cérébrales murines et de l'expression protéique de DAXX dans le striatum ayant été effectuée par Marie-Josée Demers, assistante de recherche dans le laboratoire de Pre Rona Graham. Il est à noter que les échantillons tissulaires ont été majoritairement récoltés avant mon arrivée dans le laboratoire. J'ai rédigé entièrement cet article, sous les bons conseils de Pre Rona Graham et des coauteurs.

**Résumé :** Death-associated protein 6 (DAXX) est une protéine ubiquitaire impliquée dans divers processus cellulaires tels que l'apoptose, la tumorigénèse, le développement et la transcription. Le rôle de DAXX est toutefois ambigu et plusieurs résultats contradictoires concernant ses fonctions dans l'apoptose sous divers stress cellulaires sont décrits dans la littérature. Afin d'obtenir une meilleure compréhension des rôles de DAXX au sein de l'organisme entier sous un stress physiologique, nous avons caractérisé les niveaux d'ARNm, l'expression protéique ainsi que la protéolyse de DAXX au cours du processus normal du vieillissement dans les organes périphériques et les régions cérébrales de souris C57BL/6 mâle. En général, le niveau d'ARNm de *Daxx* décroît avec le vieillissement dans le foie, le rein, le cœur, le cortex ainsi que le cervelet. En revanche, une augmentation est observée dans le striatum. L'expression protéique de DAXX et de ses fragments augmente aussi avec l'âge dans le rein, le cœur et le cortex. Dans le foie et la rate, aucune modification n'est observée alors que dans le striatum et le cervelet, certaines formes augmentent tandis que d'autres décroissent avec le vieillissement, suggérant que les fonctions de DAXX pourraient être dépendantes du type cellulaire. Cette étude fournit d'importants détails concernant l'expression et les modifications post-traductionnelle de DAXX dans le vieillissement à travers l'organisme entier et fournit des données de référence pour les dérégulations observées dans les maladies associées au vieillissement.

**Abstract**

Death-associated protein 6 (DAXX) is a ubiquitous protein implicated in various cellular processes such as apoptosis, tumorigenesis, development and transcription. The role of DAXX is however ambiguous and many contradictory results regarding its function in apoptosis upon various cellular stresses are described in the literature. In order to have a better understanding of the role of DAXX throughout the entire organism under physiological stress conditions, we have characterized the mRNA levels, protein expression and the proteolytic processing of DAXX in the normal aging process in peripheral organs and brain regions in C57BL/6 male mice. Overall, Daxx mRNA expression decreases with aging in the liver, kidney, heart, cortex and cerebellum. In contrast, an increase is observed in the striatum. The protein expression of DAXX and of its proteolytic fragments increases with aging in the kidney, heart and cortex. In liver and spleen, no changes are observed while in the striatum and cerebellum, certain forms increase and others decrease with age, suggesting that the functions of DAXX may be cell type dependent. This study provides important details regarding the expression and post-translational modifications of DAXX in aging in the entire organism and provides reference data for the deregulation observed in age-associated diseases.

## ***Introduction***

Death-associated protein 6 (DAXX) is a ubiquitous protein that participates in various cellular processes including apoptosis, tumorigenesis, transcription and cell cycle regulation (Perlman *et al.*, 2001, Roubille *et al.*, 2007, Saeed *et al.*, 2009, Salomoni *et al.*, 2006, Salomoni & Khelifi, 2006, Su *et al.*, 2007, Tang *et al.*, 2013, Torii *et al.*, 1999, Wu *et al.*, 2002, Zhao *et al.*, 2004, Zabalova *et al.*, 2008). DAXX was originally identified as a pro-apoptotic death receptor Fas/CD95 binding protein and described as a predominantly nuclear protein (Yang *et al.*, 1997, Lindsay *et al.*, 2009, Torii *et al.*, 1999). It has been shown to translocate from the nucleus to the cytoplasm under conditions of stress and to activate the Jun N-terminal kinase (JNK) pathway (Song & Lee, 2003). Thus, cellular localization is a crucial factor influencing the interaction between DAXX and Fas/CD95 (Salomoni & Khelifi, 2006). The pro-apoptotic function of DAXX is not well understood and various studies reported contradictory findings on DAXX trafficking, interactions and functions (Lindsay *et al.*, 2009, Niu *et al.*, 2011, Salomoni & Khelifi, 2006, Song & Lee, 2003, Torii *et al.*, 1999, Zabalova *et al.*, 2008). As the loss of the DAXX-like protein reduces longevity in drosophila, and some functions of DAXX have been highlighted in senescence, the pro-apoptotic functions of DAXX may be implicated in the aging process (Bodai *et al.*, 2007, Corpet *et al.*, 2014, Pan *et al.*, 2013).

DAXX is tightly regulated by post-translational modifications including phosphorylation, ubiquitination and sumoylation (Ecsedy *et al.*, 2003, Tang *et al.*, 2013, Fukuyo *et al.*, 2009, Hofmann *et al.*, 2003, Jang *et al.*, 2002). All of these post-translational modifications and others have been proposed to explain the presence of the various molecular forms of DAXX observed on SDS-PAGE and confirmed by using several DAXX antibodies (See Supplementary Table 1). As the functions of DAXX in promoting cell death are closely related to DAXX intracellular localization, post-translational modifications may influence cell death and apoptotic pathways.

Proteolytic cleavage of DAXX may be another avenue for the regulation of DAXX function (Hollenbach *et al.*, 2002, Hollenbach *et al.*, 1999, Lalioti *et al.*, 2002, Lalioti *et al.*, 2009, Michaelson *et al.*, 1999, Michaelson & Leder, 2003, Pineiro *et al.*, 2012b, Wu *et al.*, 2002). The investigation for the presence of DAXX fragments is difficult as the majority of the immunoblots presented in the literature are cut and only show the full-length and/or

hyperphosphorylated forms. However, fragments of DAXX were observed in analysis of some cell lines and tissues (Hollenbach *et al.*, 2002, Hollenbach *et al.*, 1999, Lalioti *et al.*, 2002, Lalioti *et al.*, 2009, Michaelson *et al.*, 1999, Michaelson & Leder, 2003, Pineiro *et al.*, 2012b, Wu *et al.*, 2002). Despite the presence of these fragments, little interest has been accorded to them and their possible function in apoptosis. Further support for a role of DAXX fragments in apoptosis originates from studies done using various DAXX deletion mutants. Transfection of these DAXX fragments has shown strikingly differential effects on the level of apoptosis induction in many cells lines (HeLa, HEK293 and L929) (Yang *et al.*, 1997). Strong apoptotic effects were attributed to specific fragments, such as the deletion mutant DAXX 501-625 and DAXX C501. The DAXX C-terminal fragment has been used as a dominant negative form of DAXX (Song & Lee, 2004b, Yang *et al.*, 1997).

Interestingly, caspase-6 has been identified as the first mammalian protease involved in the proteolysis of DAXX (Graham *et al.*, 2012). In various pathological conditions such as aging and neurodegenerative diseases, the increased activity of caspases and other proteases has been hypothesized to contribute to the production of proteolytic fragments and this may play a role in the apoptotic functions of DAXX (Shalini *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2002, Rohn, 2010, Roth, 2001, Albrecht *et al.*, 2007, Graham *et al.*, 2010, Graham *et al.*, 2006, Graham *et al.*, 2011a).

DAXX functions appear to be regulated in a cell-type dependent manner. *In vitro* stress conditions used previously have led to contradictory results regarding the effect on DAXX function(s). In order to use a physiological stress condition, and to have a better understanding of the role of DAXX throughout the entire organism, we here have characterized the mRNA levels, protein expression and the proteolytic processing of DAXX in the normal aging process in peripheral organs (liver, kidney, heart, spleen) and brain regions (cortex, cerebellum, striatum and hippocampus) in C57BL6 male mice. These organs were chosen for their relevance in metabolic, inflammatory and neurological processes which are highly affected in the normal aging. This study provides important details regarding the expression and the post-translational modifications of DAXX in aging and new insights in its regulation observed in age-associated diseases.

## ***Material and methods***

### ***Animals***

Peripheral organs and brain regions were collected as described previously from C57BL6 male mice and grouped according to age: 3-4 months (young), 12 months (adult), 23-28 months (old) and older than 30 months (very old) (Lessard-Beaudoin *et al.*, 2015). The protocols for this study were approved by the animal care and ethics committee of University of Sherbrooke. The mice were anaesthetized (Isoflurane, Abbott) and euthanized by cervical dislocation. The upper part of the cranium was removed, and the brain was collected. The cortex, the cerebellum, the striata and the hippocampi were then dissected. In parallel, kidney, liver, heart and spleen were harvested. As estrogen will influence not only the reproductive process, but also various physiological processes such as metabolism, cardiovascular and renal functions, it would have been informative to include both sexes in the study and see the effect of gender on our results (Wren, 1992, Gangula *et al.*, 2013). However, due to financial constraints, only males were included in the study.

### **Western Blot analysis**

Peripheral organs and brain regions were homogenized and sonicated in lysis buffer (0.32 mM Sucrose, 20 mM Tris pH 7.2, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA pH 7.2) containing protease inhibitors (Roche), 4.2 mM PefaBloc SC (Roche) and 10 $\mu$ M Z-VAD-fmk (Enzo Lifes Sciences) and clarified by centrifugation at 13,000 rpm. The protein concentration was determined using the BCA (bicinchoninic acid) protein assay kit (Pierce). Protein lysates (50  $\mu$ g) were separated on a 7.5% SDS-PAGE gel and transferred to a PVDF membrane (PerkinElmer). The membranes were probed with anti-DAXX (1:1000, ab105173, Abcam) or anti-actin (1:1000, MAB1501, Millipore) antibodies. Peroxidase activity was detected and densitometric values were obtained with the Odyssey Fc imaging system (Mandel) using Luminata Crescendo Western HRP substrate (Millipore). Quantification of  $\beta$ -actin or Coomassie staining was used to standardize the amount of protein in each lane depending on the protein stability in each organ and densitometric values obtained with the Odyssey Fc imaging system (Mandel). Relative density values were calculated by dividing the raw density of DAXX by the reference density level. All data are presented relative to the 3-4 months age-group data. A n=4 by age-group was used for the protein expression analysis.

### **Real-Time Quantitative RT-PCR**

Total RNA was extracted from tissues with the RNeasy mini kit (QIAGEN) and cDNAs were prepared using ProtoScript Reverse Transcriptase II (New England BioLabs). Quantification was done using Mx3005P QPCR Systems (Stratagene) with mouse-specific beta-actin primers (forward 5'-ACGGCCAGGTCATCACTATTG-3'; reverse 5'-CAAGAAGGAAGGCTGGAAAAGA-3') and mouse-specific DAXX primers (forward 5'-CTCTCCAGGGTTCTGTCTCG-3'; reverse 5'-GGGATCTGTGGGAGGGTTAT-3'). Amplification of beta-actin was used to standardize the amount of sample RNA in the reaction. Gene-expression levels were measured using MxPro QPCR Software (Stratagene). Relative density values were calculated by dividing the raw Ct of DAXX by that of Ct  $\beta$ -actin. All data presented are presented relative to the 3-4 months age-group data. A n=5 by age-group was used for the mRNA expression analysis.

### **Caspase cleavage assays**

Recombinant caspases were diluted in a reaction buffer (100 mM Hepes pH 7.4, 200 mM NaCl, 0.2% CHAPs, 2 mM EDTA, 20% glycerol) at a concentration of 1000 nM and serially diluted. Final concentrations used for each caspase in the assay were 0, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, and 1000 nM. The concentrations of caspases used are similar to those chosen in a previous article using the same active site-titrated recombinant caspases (Scott *et al.*, 2008). The diluted recombinant caspases and 50  $\mu$ g of brain lysate were pre-heated separately at 37°C for 30 min, were mixed and then incubated for 1 h at 37°C. Immunoblotting was performed as described above.

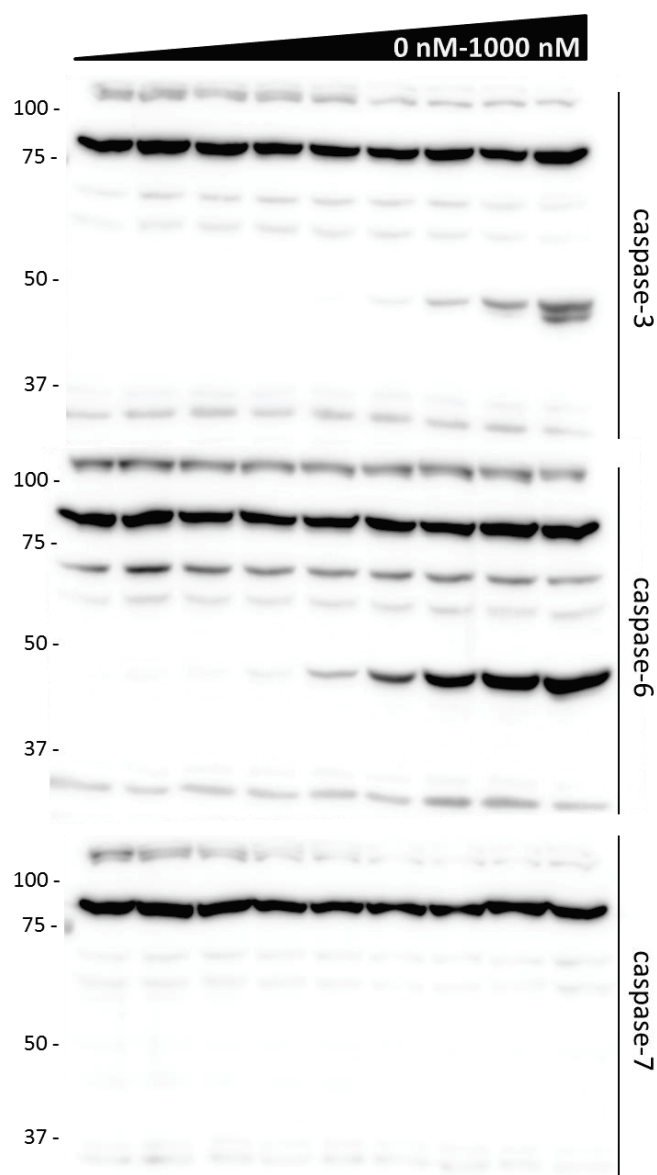
### **Statistical analysis**

Student t test, one-way ANOVA and the post hoc Tukey's multiple comparisons test were used for analysis between the age groups. The statistical significance was established at 0.05 (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001). GraphPad Prism 6.0 software was used for all statistical analysis (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).



## Results

### DAXX cleavage by caspase-3 and 6

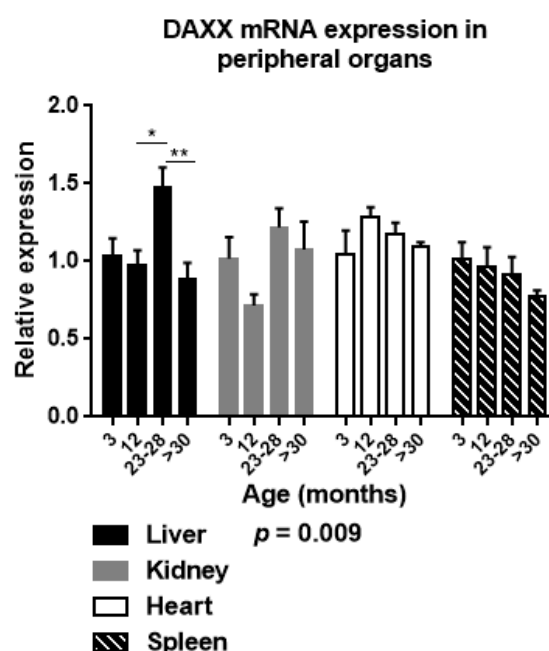


*Figure 1 DAXX protein is cleaved by caspases 3 and 6.*

Brain lysate was incubated with various concentrations of recombinant caspases 3, 6 and 7 for 1 h at 37°C. The concentration of caspases from lane 1 to 9 are 0, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 nM respectively. Proteins were analyzed by immunoblotting. DAXX is cleaved by caspase 3 and 6 into ~47 kDa fragments however with different efficiencies (caspase-6 > caspase-3). No proteolytic fragments were observed with caspase-7.

Incubation of brain lysates with human recombinant caspases-3 or -6 both resulted in the cleavage of DAXX and the production of a ~47 kDa fragment, but with different efficacies (**Fig. 1**). Whereas relatively low concentration of caspase-6 was sufficient to produce a cleavage product, only the highest concentrations of caspase-3 generated such a fragment. The fragment was observed at a concentration starting at 62.5 nM and 250 nM for caspase-6 and caspase-3, respectively (**Fig. 1**). No cleavage of DAXX was generated by caspase-7.

### General decrease of *Daxx* mRNA expression levels in peripheral organs and brain regions of aged mice

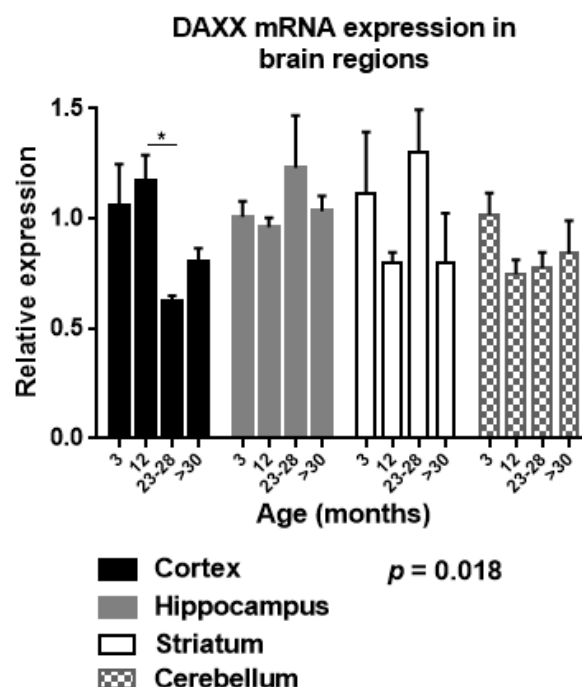


**Figure 2** *Daxx* mRNA expression decreases with aging in peripheral organs.

mRNA expression of DAXX increases in the liver at 23-23 months of age and then decreases (ANOVA  $p=0.009$ , post-hoc: 12 vs 23-28 mo,  $p<0.05$ ; 23-28 vs >30 mo,  $p<0.01$ ). *Daxx* mRNA expression increase in the kidney ( $t$  test: 12 vs 23-28 mo,  $p<0.01$ ). A decrease in *Daxx* mRNA expression is observed in the heart at >30 months of age ( $t$  test: 12 vs >30 mo,  $p<0.05$ ). No significant variation is observed in the spleen with aging.

In order to have a better understanding of the role of DAXX throughout the entire organism, we used RT-PCR to determine *Daxx* mRNA expression. Using this approach, we observed an increase of *Daxx* mRNA expression in the liver and the kidney at 23-28

months of age (**Fig. 2**). In contrast, an age-dependent *Daxx* mRNA expression depletion over time was observed in the heart with aging (**Fig. 2**). No significant variation for *Daxx* mRNA expression levels was denoted in the spleen.

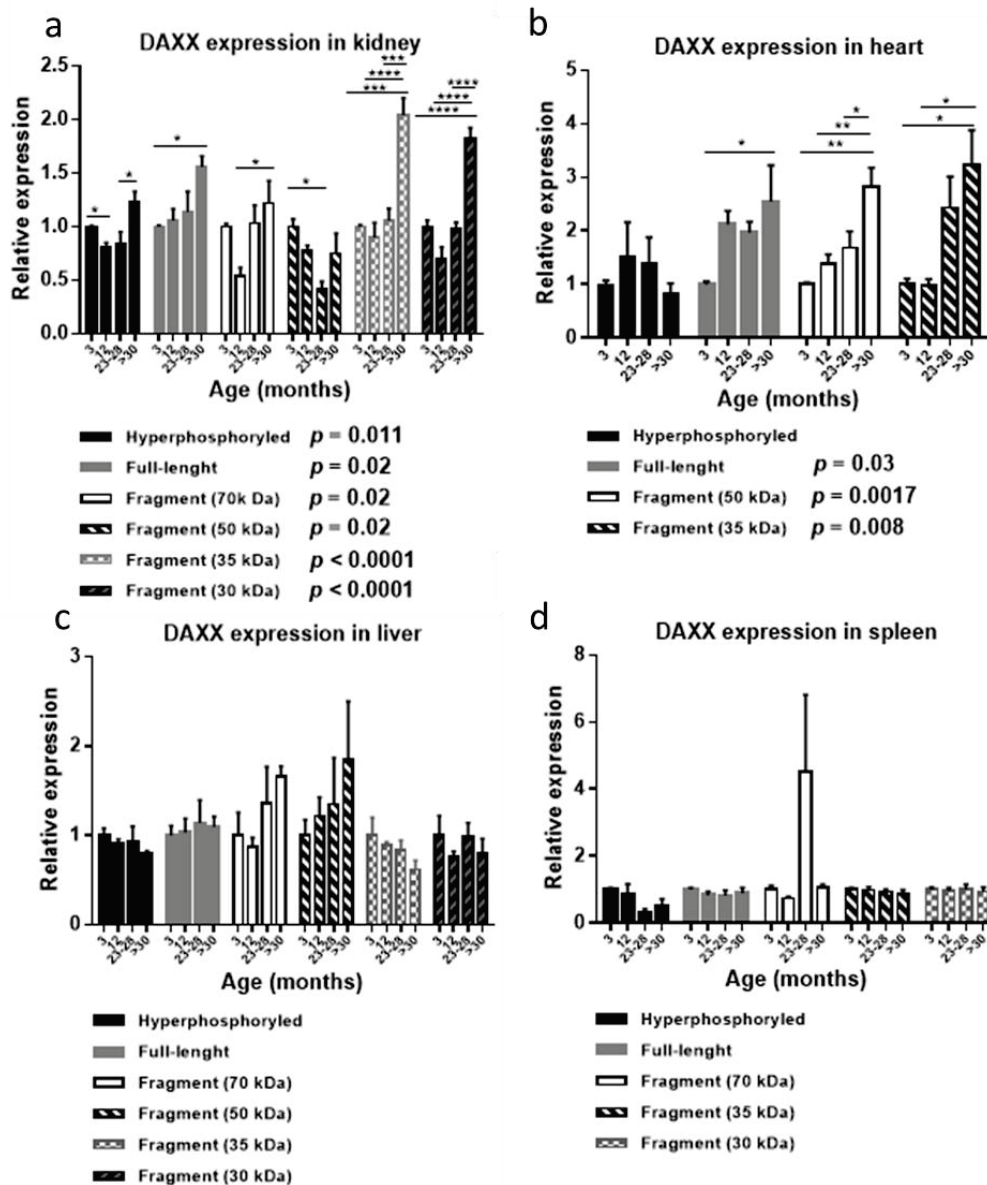


**Figure 3. Differential expression of *Daxx* mRNA with aging in brain regions.**

*Daxx* mRNA expression decreases with age in the cortex (ANOVA  $p=0.018$ , post hoc: 12 vs 23-28 mo,  $p<0.05$ ). No significant variation is observed in the hippocampus. An increase in *Daxx* mRNA expression is observed at 23-28 months of age in the striatum (t test: 12 vs 23-28 mo,  $p<0.05$ ). A decrease is observed in the cerebellum at 23-28 months of age (t test: 3 vs 12 mo,  $p<0.05$ ).

*Daxx* mRNA expression was decreased in the cortex and the cerebellum at 23-28 and 12 months of age, respectively (**Fig. 3**). In contrast, a significant increase (1.62 fold) in *Daxx* mRNA expression was observed at 23-28 months of age in the striatum (**Fig. 3**). No significant variation is observed in the hippocampus. Interestingly, within the same brain, the different regions studied showed marked differences in temporal expression patterns of *Daxx* mRNA.

## Overall increase of DAXX protein expression and cleavage in the aging kidney and heart



**Figure 4** Alteration in DAXX protein expression and fragment levels in heart and kidney with age.

a) An increase in all forms and fragments of DAXX, except for the 50 kDa fragment which decreases, is observed in the kidney with age (pDAXX: ANOVA  $p=0.011$ ; DAXX FL: ANOVA  $p=0.02$ ; Fragment (70 kDa): ANOVA  $p=0.02$ ; Fragment (50 kDa): ANOVA  $p=0.02$ ; Fragment (35 kDa): ANOVA  $p<0.0001$ ; Fragment (30 kDa): ANOVA  $p<0.0001$ ).

b) A global increase of the full-length protein and the fragments of DAXX is observed with

aging in the heart (DAXX FL: ANOVA  $p=0.03$ ; Fragment (50 kDa): ANOVA  $p=0.0017$ ; Fragment (35 kDa): ANOVA  $p=0.008$ ) **c)** The pDAXX and the 35 kDa fragment of DAXX decrease in the liver with aging while the 70 kDa and the 45 kDa fragments increase (pDAXX:  $t$  test, 3 vs >30 mo,  $p<0.05$ ; Fragment (70 kDa):  $p<0.01$ ; Fragment (45 kDa): 3 vs 12 mo,  $p<0.05$ ; 3 vs 23-28 m,  $p<0.05$ ; 12 vs >30 mo,  $p<0.05$ ; Fragment (35 kDa):  $t$  test, 12 vs >30 mo,  $p<0.05$ ). **d)** In the spleen, only the 70 kDa fragment increase with the age ( $t$  test, 12 vs >30 mo,  $p<0.05$ ). Licor quantification of Coomassie staining of the western blot was used as loading control. pDaxx= Hyperphosphorylated DAXX, FL= Full-length.

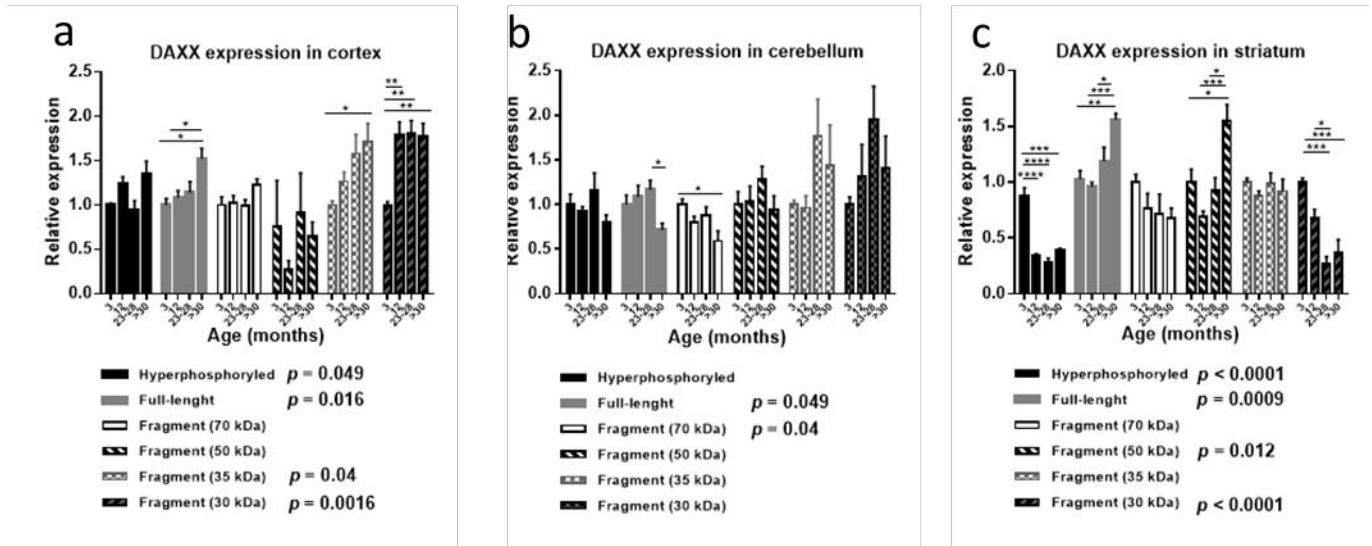
In spite of a decrease in *Daxx* mRNA expression observed at 12 months of age in the kidney, western blot analyses have revealed that all forms of DAXX, including full-length, hyperphosphorylated (pDAXX) and fragments of DAXX, were augmented in this tissue with age with the exception of the 50 kDa fragment which was decreased in older mice (23-28 months) (**Fig. 4A**). In the heart, a similar augmentation was observed for the full-length protein, and for the 50 kDa and 30 kDa fragments in mice older than 30 months (**Fig. 4B**).

In contrast to the kidney and the heart, only slight variations of DAXX protein expression levels were denoted in the liver and spleen. In the liver, *Daxx* mRNA expression was significantly decreased at 23-28 months of age. At the protein level, the pDAXX and the 35 kDa fragment decrease with age (**Fig. 4C**). In contrast, at the same age, a significant 1.8 fold increase was observed for the 70 kDa form (**Fig. 4C**). In the spleen, only a trend increase of the 70 kDa form of DAXX was observed at >30 months (**Fig. 4D**).

### **Region-specific variations in DAXX protein expression and post-translational modification were observed in the aging brain**

In contrast to the mRNA expression, all forms of DAXX including the full-length, pDAXX and the fragments were increased or tend to increase, with age in the cortex (**Fig. 5A**). According to the trend observed in the cerebellum, depletion in mRNA expression at 12 months of age, a decrease was also observed with aging in protein expression of the full-length DAXX and the 70 kDa fragment expression in this brain area (**Fig. 5B**). However, the decrease in protein expression observed at >30 months of age suggests that mRNA decay was not solely responsible for this decrease. In contrast to the 70 kDa fragment, the

30 kDa fragment was increased with aging (**Fig. 5B**). In the striatum, a decrease in expression of the pDAXX and its 70 kDa and 30 kDa fragments was denoted with aging, which may reflect a reduction in post-translational modifications (**Fig. 5C**). However, the full-length and the 50 kDa fragment of DAXX increased with aging in the striatum, which complements the increasing mRNA expression observed in this brain region (**Fig. 5C**). In addition to the absence of correlation between the protein and mRNA expression levels, differential variation among all brain regions was also observed at the protein level.



**Figure 5. DAXX protein expression varies in cortex, cerebellum and striatum with aging.**

a) In the cortex, all forms and fragments of DAXX increase, or tend to increase with age (pDAXX: ANOVA  $p=0.04$ ; DAXX FL: ANOVA  $p=0.016$ , post hoc: 3 vs >30 mo,  $p<0.05$ ; 12 vs >30 mo,  $p<0.05$ ; Fragment (70 kDa): t test, 23-28 vs >30 mo,  $p<0.05$ ; Fragment (50 kDa): t test, 12 vs >30 mo,  $p<0.05$ ; Fragment (35 kDa): ANOVA  $p=0.03$ , post hoc: 3 vs >30 mo,  $p<0.05$ ; Fragment (30 kDa): ANOVA  $p=0.0016$ , post hoc: 3 vs 12 mo,  $p<0.01$ ; 3 vs 23-28 mo,  $p<0.01$ ; 3 vs >30 mo,  $p<0.01$ ). b) FL and the 70 kDa fragment of DAXX decreases while the 30 kDa fragment increase with aging in the cerebellum (DAXX FL: ANOVA  $p=0.049$ , post hoc: 23-28 vs >30 mo,  $p<0.05$ ; Fragment (70 kDa): ANOVA  $p=0.0354$ , post hoc: 3 vs >30 mo,  $p<0.05$ ; Fragment (30 kDa): t test, 3 vs 23-28 mo,  $p<0.01$ ). c) The FL and the 50 kDa fragment of DAXX increases and the pDAXX, the 70 kDa and 30 kDa fragment decreases or tends to decrease with the age in the striatum (pDAXX: ANOVA  $p<0.0001$ , post hoc: 3 vs 12 mo,  $p<0.0001$ ; 3 vs 23-28 mo,  $p<0.0001$ ; 3

vs >30 mo,  $p < 0.001$ ; DAXX FL: ANOVA  $p = 0.0009$ , post hoc: 3 vs >30 mo,  $p < 0.01$ ; 12 vs >30 mo,  $p < 0.001$ ; 23-28 vs >30 mo,  $p < 0.05$ ; Fragment (70 kDa): t test, 3 vs >30 mo,  $p < 0.05$ ; Fragment (50 kDa): ANOVA  $p < 0.0001$ , post hoc: 3 vs >30 mo,  $p < 0.05$ ; 12 vs >30 mo,  $p < 0.001$ ; 23-28 vs >30 mo,  $p < 0.05$ ; Fragment (30 kDa): ANOVA  $p < 0.0001$ , post hoc: 3 vs 23-28 mo,  $p < 0.001$ ; 3 vs >30 mo,  $p < 0.001$ ; 12 vs 23-28 mo,  $p < 0.05$ ). FL=full length, pDAXX=hyperphosphorylated DAXX.

## Discussion

The function of DAXX throughout the organism is not well established. Various studies have reported contradictory results on its trafficking, interaction with partners, pro-apoptotic or anti-apoptotic effects, which all appear dependent on the stimuli or the cell line used for the experiment. Furthermore, the reliability of stimuli used on cell lines as well as the relevancy of cellular models to understand complex physiological processes are under debate (Lindsay *et al.*, 2009). We therefore assessed DAXX expression throughout the peripheral organs (liver, kidney, heart and spleen) and brain regions (cortex, cerebellum, hippocampus, striatum) in the normal murine aging process (3 to 30 months of age). The organs were chosen for their relevance in inflammatory, metabolic and neurodegenerative processes. Overall, *Daxx* mRNA expression, protein levels and post-translational modifications (phosphorylation and proteolytic fragments) are organ specific and modulated by aging suggesting distinct roles for the various forms of DAXX. In light of our results, and the existing literature, each organ does not respond the same way to the aging process reflecting the metabolic and apoptotic particularities of each organ.

The increase in the number of TUNEL-positive cells in glomerular and corticotubular areas in the kidney observed in aged C57BL/6 mice is associated with an increase in reactive oxygen species (ROS) as well as a decrease in renal clearance and renal functions (Lim *et al.*, 2012b). An increase in the mRNA and protein expression of DAXX in the presence of oxidative stress have been reported previously, therefore, the global increase in DAXX forms observed in the kidney may due to the increase in ROS previously observed with aging (Beckman & Ames, 1998, Papa & Skulachev, 1997, Ruiz-Torres *et al.*, 1997, Kim *et al.*, 2005). In our data, a similar increase was observed at the mRNA level and protein level in the aging kidney. In light of these results, the increase in DAXX protein expression we observed may be attributable to an increase in ROS and gene

expression with aging rather than post-translational modifications affecting the half-life of the protein or a less efficient degradation mechanism with aging.

When considering only the pro-apoptotic functions of DAXX in the heart, increased expression of all forms of DAXX, as we have observed in our experiments, would be consistent with the ~30% cardiomyocytes loss and the increase in cardiovascular issues observed with aging (Sheydina *et al.*, 2011b, Davis, 2014). The pro-apoptotic functions of DAXX in cardiomyocytes are however contradicted by Zabalova *et al.* who observed an increase in peroxide-induced apoptosis when DAXX expression was suppressed (Zabalova *et al.*, 2008). Others have also shown anti-apoptotic functions for DAXX. Indeed, the interaction of DAXX with mdm2 results in an increase in stability of mdm2 activity that leads to the degradation of p53 (Tang *et al.*, 2006). Thus, the depletion of DAXX may promote apoptosis by the suppression of its anti-apoptotic function. Of note, numerous caspase substrates show both pro and anti-apoptotic functions, which may be explained by the specific roles of the full-length protein vs. their fragment in apoptosis (Chan *et al.*, 2009, Levkau *et al.*, 1999, Mazars *et al.*, 2009). The global increase of DAXX protein expression levels with aging in kidney may imply post-translational modifications such as ASK1 phosphorylation of Ser172 and Ser184 and the poly-ubiquitination at Lys122, which are described to promote the accumulation of DAXX, to increase its half-life and to promote the production of specific fragments (Fukuyo *et al.*, 2009).

In contrast to other cell types, hepatocytes have a long life span and rarely proliferate except in the case of injury or during liver regeneration. In response to methyl methanesulfonate treatment, the liver of old rats does not enter apoptosis as efficiently as the liver of their younger counterparts (Suh, 2002b). As a protein highly involved in cell cycle regulation and apoptosis, it is perhaps not surprising that DAXX expression in the liver did not present strong variations with aging (Drane *et al.*, 2010, Giovinazzi *et al.*, 2012, Gostissa *et al.*, 2003, Kwan *et al.*, 2013, Salomoni & Khelifi, 2006, Tang *et al.*, 2013, Tang *et al.*, 2006, Zhao *et al.*, 2004). Interestingly, the mRNA levels show an increase in the transcription of *Daxx* at 23-28 months of age in this tissue, but this does not translate into an increase in protein expression. The absence of variation in the full-length form in contrast to the mRNA may be the results of post-translational modifications of DAXX. As the full-length form is cleaved or degraded, new protein may be produced, refilling the



protein pool upon degradation which stabilizes the full-length protein level. The slight increase in the 70 kDa form of DAXX may support this hypothesis. Moreover, the stable expression of DAXX may be important in the hepatocytes to preserve its anti-apoptotic functions in absence of cellular stress.

Apoptotic hallmarks, such as an increase in caspase expression, DNA fragmentation and decrease in the anti-apoptotic protein Bcl-2 were previously observed in aging rodent splenocytes. Surprisingly, in spite of these apoptotic signs, we only observed a slight variation in the 70 kDa molecular form of DAXX in this organ (Zhang *et al.*, 2002, Itzhaki *et al.*, 2003). Of note, we found considerable variation of this fragment level for the 23-28 month age-group. Interestingly, in a previous report we observed a large standard deviation in the spleen weight within this age group (Lessard-Beaudoin *et al.*, 2015). Although no abnormality was apparent at the time of dissection, it cannot be ruled out that in this age-group a pathological state could be responsible for the results. In contrast to other cell types, it has been previously observed that when splenocytes were treated with concanavalin A or retinoic acid, DAXX translocates to the nucleus instead of the cytoplasm, as observed in other cell types (Zhong *et al.*, 2000). In light of these results, DAXX may have a particular function in splenocytes. Moreover, there is a possibility that variations of DAXX with aging in this organ may be more attributable to a change of localization instead of a variation in mRNA or protein expression.

In the cortex, we observed a decrease in *Daxx* mRNA expression with aging that does not translate at the protein level, for which an increase is observed in all protein forms. This accumulation of the protein form of DAXX may be explained by a change in mRNA stability or a decrease in proteasome activity previously observed in the cortex with aging which may increase the half-life of the protein (Baraibar & Friguet, 2012). Another hypothesis is that some post-translational modifications of DAXX may increase with age in the cortex. As an example, the phosphorylation of DAXX by ASK1 and the ubiquitination at Lys122, which leads to protein stabilization of DAXX, may be deregulated in the aging cortex. Of note, the ASK1-MKK3/6-p38MAPK pathway, which is influenced by DAXX functions, is involved in A $\beta$ -induced cell death and may be implicated in the tau phosphorylation pathway, two major components relevant in Alzheimer's disease (Song *et al.*, 2014). The accumulation of pro-apoptotic proteins like DAXX and their fragments

would be consistent with neuronal cell loss and the decrease in cerebral white matter integrity with age that is associated with several cognitive performance tasks (Bennett & Madden, 2014). Interestingly, an increase in expression level of caspase-6, a protease recently implicated in DAXX processing, has previously been observed with aging in BALB/c and FVB mice which may result in increased cleavage of DAXX (Jiang *et al.*, 2001, Graham *et al.*, 2010, Graham *et al.*, 2012).

Similar to the results in the cortex, *Daxx* mRNA expression decreases in the cerebellum with aging. At the protein level, there is a decrease in the full-length and the 70 kDa forms expression at 30 months of age. Previously, a ~2.5% loss per decade of Purkinje cells in the cerebellum has been observed (Xu *et al.*, 2000). However, others have demonstrated a stable number of Purkinje cells in most parts of the cerebellum, except in the anterior lobe, in which a loss of 40.9% was observed with aging (Andersen *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2010). Moreover, morphological effect of aging on specific parts of the cerebellum has been shown to correlate with certain motor and cognitive performance (Bernard & Seidler, 2014). The variation in DAXX protein expression and its 70 kDa fragment at a very old age (>30 months) may reflect the age-related morphological changes in the cerebellum and play a role in the motor and cognitive deficits observed with advanced age.

In the striatum, an increase is observed at the mRNA level at 23-28 months of age, which may be responsible for the increase of the full-length protein at a later time-point. The strong decrease in pDAXX at 12 months of age may reflect deregulation in post-translational modifications such as ubiquitination, sumoylation or phosphorylation of DAXX with aging, which would contribute to the upper molecular weight bands of DAXX. The variations observed in DAXX fragments in the striatum indicate that DAXX cleavage may be regulated differentially in this tissue with the aging process as well. As strong apoptotic effects has been attributed to specific fragment of DAXX, all of these post-translational modifications combined with its increased expression, may take part in the increased age-associated apoptosis observed in the striatum by Ureshino *et al.* and corroborated by the increase in active caspase expression by Graham *et al.* (Ureshino *et al.*, 2010, Graham *et al.*, 2010).

In contrast to the increase in *Daxx* mRNA previously observed in aging and Alzheimer's disease, no variation in the mRNA expression of *Daxx* was observed in the hippocampus in our study (Lukiw, 2004). However, in the previous study, only foetal and adulthood has been compared which may explain the difference with our results. A previous study noted increased level of enzymes involved in the mitochondria respiratory chain in the hippocampus with aging in BALB/c mice (Jiang *et al.*, 2001). Without a change in *Daxx* mRNA in the hippocampus there is a possibility that DAXX protein expression may vary as a result of ROS formation, stimuli often related to the expression or modification of DAXX. However, the limited amount of hippocampus did not permit us to analyze the protein expression in this brain region.

## **Conclusion**

A variety of cell lines and cellular stressors have been used to assess DAXX expression, modifications and investigate function, but few studies were performed on complex physiological processes *in vivo*. In this study, our results suggest distinct roles for the various forms of DAXX, reflecting the metabolic and apoptotic particularities of each organ during the aging process. Therefore, this study provides important details regarding the expression and the post-translational modifications of DAXX in the entire organism upon a physiological stress such as the normal aging process. In addition, these data may serve as a foundation for the study of DAXX regulation in age-associated diseases and its role throughout the organism.

**Acknowledgements**

This research was undertaken, in part, by the Canada Research chairs program. RKG holds the Canada Research Chair in Neurodegenerative diseases. MLB held/holds scholarships from the Research Centre on Aging, the Faculty of Medicine and Health Sciences of the University of Sherbrooke, the Canadian Institute for Health Research (CIHR) and Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQ-S). This work was supported in part by a grant from the Canadian Institute for Health Research (CIHR; to GG) and an investigator award from the Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS; to GG and JBD).

## References

- Albrecht S, Bourdeau M, Bennett D, Mufson EJ, Bhattacharjee M, LeBlanc AC. 2007. Activation of caspase-6 in aging and mild cognitive impairment. *The American journal of pathology* 170:1200-1209.
- Andersen BB, Gundersen HJ, Pakkenberg B. 2003. Aging of the human cerebellum: a stereological study. *J Comp Neurol* 466:356-365.
- Baraibar MA, Friguet B. 2012. Changes of the proteasomal system during the aging process. *Prog Mol Biol Transl Sci* 109:249-275.
- Beckman KB, Ames BN. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78:547-581.
- Bennett IJ, Madden DJ. 2014. Disconnected aging: cerebral white matter integrity and age-related differences in cognition. *Neuroscience* 276:187-205.
- Bernard JA, Seidler RD. 2014. Moving forward: age effects on the cerebellum underlie cognitive and motor declines. *Neurosci Biobehav Rev* 42:193-207.
- Bodai L, Pardi N, Ujfaludi Z, Bereczki O, Komonyi O, Balint E, Boros IM. 2007. Daxx-like protein of *Drosophila* interacts with Dmp53 and affects longevity and Ark mRNA level. *J Biol Chem* 282:36386-36393.
- Chan YW, Chen Y, Poon RY. 2009. Generation of an indestructible cyclin B1 by caspase-6-dependent cleavage during mitotic catastrophe. *Oncogene* 28:170-183.
- Corpet A, Olbrich T, Gwerder M, Fink D, Stucki M. 2014. Dynamics of histone H3.3 deposition in proliferating and senescent cells reveals a DAXX-dependent targeting to PML-NBs important for pericentromeric heterochromatin organization. *Cell Cycle* 13:249-267.
- Davis LL. 2014. Cardiovascular issues in older adults. *Crit Care Nurs Clin North Am* 26:61-89.
- Drane P, Ouararhni K, Depaux A, Shuaib M, Hamiche A. 2010. The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev* 24:1253-1265.
- Ecsedy JA, Michaelson JS, Leder P. 2003. Homeodomain-interacting protein kinase 1 modulates Daxx localization, phosphorylation, and transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 23:950-960.
- Fukuyo Y, Kitamura T, Inoue M, Horikoshi NT, Higashikubo R, Hunt CR, Usheva A, Horikoshi N. 2009. Phosphorylation-dependent Lys63-linked polyubiquitination of Daxx is essential for sustained TNF- $\alpha$ -induced ASK1 activation. *Cancer Res* 69:7512-7517.
- Gangula PR, Dong YL, Al-Hendy A, Richard-Davis G, Montgomery-Rice V, Haddad G, Millis R, Nicholas SB, Moseberry D. 2013. Protective cardiovascular and renal actions of vitamin D and estrogen. *Front Biosci (Schol Ed)* 5:134-148.
- Giovinazzi S, Lindsay CR, Morozov VM, Escobar-Cabrera E, Summers MK, Han HS, McIntosh LP, Ishov AM. 2012. Regulation of mitosis and taxane response by Daxx and Rassf1. *Oncogene* 31:13-26.
- Gostissa M, Hofmann TG, Will H, Del Sal G. 2003. Regulation of p53 functions: let's meet at the nuclear bodies. *Curr Opin Cell Biol* 15:351-357.
- Graham RK, et al. 2010. Cleavage at the 586 amino acid caspase-6 site in mutant huntingtin influences caspase-6 activation in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:15019-15029.
- Graham RK, et al. 2006. Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell* 125:1179-1191.
- Graham RK, Ehrnhoefer DE, Hayden MR. 2011. Caspase-6 and neurodegeneration. *Trends in neurosciences* 34:646-656.

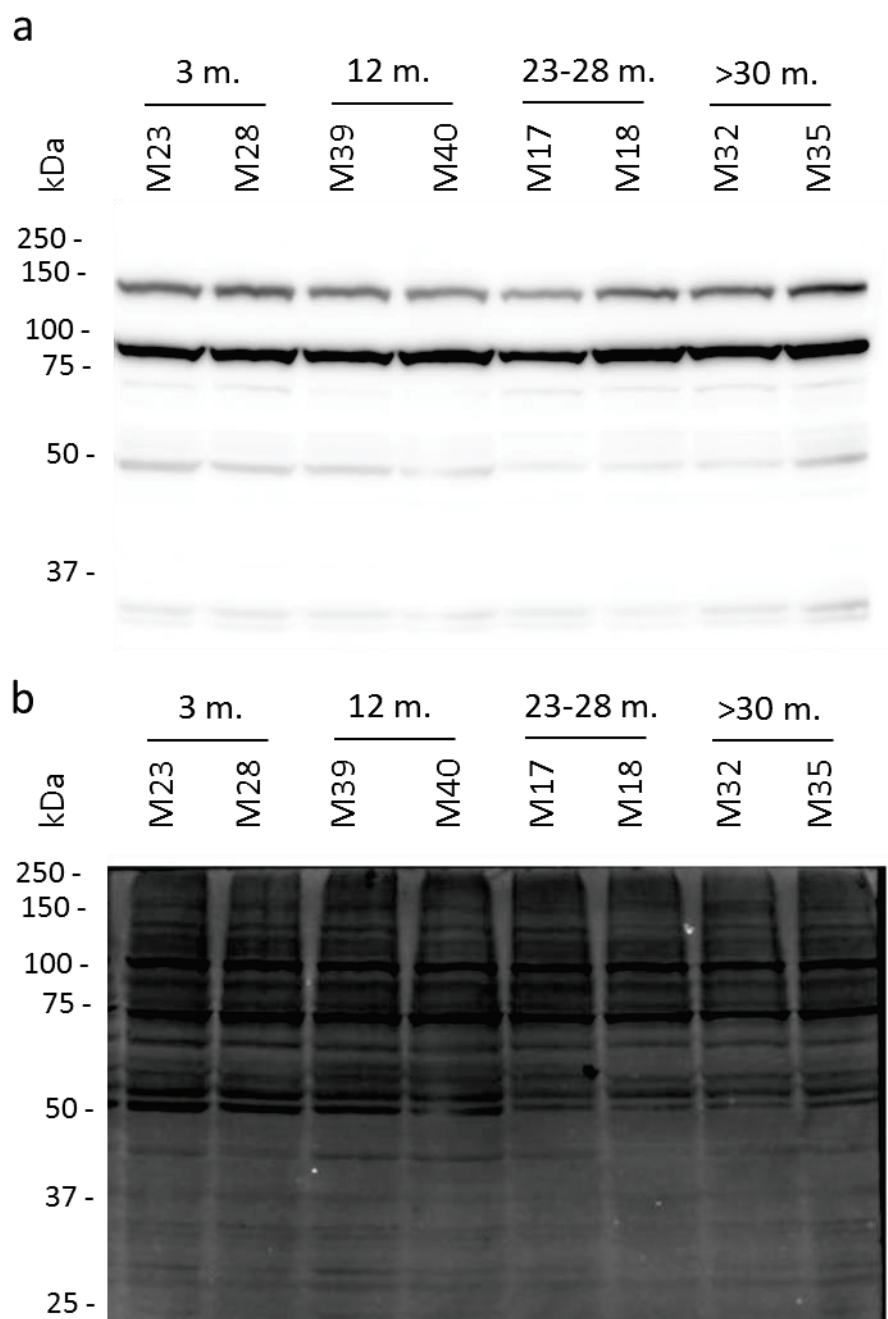
- Graham RK, Riechers S, Butland S, Deng Y, Skotte N, Russ J, Arunachalam V, Wanker E, Hayden MR. 2012. Characterization of the caspase-6 interactome identifies novel substrates that play a role in the pathogenesis of HD. Society for Neuroscience Conference.
- Hofmann TG, Stollberg N, Schmitz ML, Will H. 2003. HIPK2 regulates transforming growth factor-beta-induced c-Jun NH(2)-terminal kinase activation and apoptosis in human hepatoma cells. *Cancer Res* 63:8271-8277.
- Hollenbach AD, McPherson CJ, Mientjes EJ, Iyengar R, Grosveld G. 2002. Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *J Cell Sci* 115:3319-3330.
- Hollenbach AD, Sublett JE, McPherson CJ, Grosveld G. 1999. The Pax3-FKHR oncoprotein is unresponsive to the Pax3-associated repressor hDaxx. *EMBO J* 18:3702-3711.
- Itzhaki O, Skutelsky E, Kaptzan T, Sinai J, Michowitz M, Huszar M, Leibovici J. 2003. Ageing-apoptosis relation in murine spleen. *Mech Ageing Dev* 124:999-1012.
- Jang MS, Ryu SW, Kim E. 2002. Modification of Daxx by small ubiquitin-related modifier-1. *Biochem Biophys Res Commun* 295:495-500.
- Jiang CH, Tsien JZ, Schultz PG, Hu Y. 2001. The effects of aging on gene expression in the hypothalamus and cortex of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1930-1934.
- Kim KS, Hwang HA, Chae SK, Ha H, Kwon KS. 2005. Upregulation of Daxx mediates apoptosis in response to oxidative stress. *J Cell Biochem* 96:330-338.
- Kwan PS, Lau CC, Chiu YT, Man C, Liu J, Tang KD, Wong YC, Ling MT. 2013. Daxx regulates mitotic progression and prostate cancer predisposition. *Carcinogenesis* 34:750-759.
- Lalioti VS, Vergarajauregui S, Pulido D, Sandoval IV. 2002. The insulin-sensitive glucose transporter, GLUT4, interacts physically with Daxx. Two proteins with capacity to bind Ubc9 and conjugated to SUMO1. *The Journal of biological chemistry* 277:19783-19791.
- Lalioti VS, Vergarajauregui S, Tsuchiya Y, Hernandez-Tiedra S, Sandoval IV. 2009. Daxx functions as a scaffold of a protein assembly constituted by GLUT4, JNK1 and KIF5B. *J Cell Physiol* 218:416-426.
- Lessard-Beaudoin M, Laroche M, Demers MJ, Grenier G, Graham RK. 2015. Characterization of age-associated changes in peripheral organ and brain region weights in C57BL/6 mice. *Exp Gerontol* 63:27-34.
- Levkau B, Scatena M, Giachelli CM, Ross R, Raines EW. 1999. Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated dominant-negative NF-kappa B loop. *Nat Cell Biol* 1:227-233.
- Lim JH, et al. 2012. Age-associated molecular changes in the kidney in aged mice. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012:171383.
- Lindsay CR, Giovinazzi S, Ishov AM. 2009. Daxx is a predominately nuclear protein that does not translocate to the cytoplasm in response to cell stress. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 8:1544-1551.
- Lukiw WJ. 2004. Gene expression profiling in fetal, aged, and Alzheimer hippocampus: a continuum of stress-related signaling. *Neurochem Res* 29:1287-1297.
- Mazars A, Fernandez-Vidal A, Mondesert O, Lorenzo C, Prevost G, Ducommun B, Payrastra B, Racaud-Sultan C, Manenti S. 2009. A caspase-dependent cleavage of CDC25A generates an active fragment activating cyclin-dependent kinase 2 during apoptosis. *Cell Death Differ* 16:208-218.
- Michaelson JS, Bader D, Kuo F, Kozak C, Leder P. 1999. Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes Dev* 13:1918-1923.
- Michaelson JS, Leder P. 2003. RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of DAXX. *Journal of cell science* 116:345-352.
- Niu YL, Li C, Zhang GY. 2011. Blocking Daxx trafficking attenuates neuronal cell death following ischemia/reperfusion in rat hippocampus CA1 region. *Arch Biochem Biophys* 515:89-98.

- Pan WW, Yi FP, Cao LX, Liu XM, Shen ZF, Bu YQ, Xu Y, Fan HY, Song FZ. 2013. DAXX silencing suppresses mouse ovarian surface epithelial cell growth by inducing senescence and DNA damage. *Gene* 526:287-294.
- Papa S, Skulachev VP. 1997. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem* 174:305-319.
- Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA. 2001. TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol* 3:708-714.
- Pineiro D, Ramajo J, Bradrick SS, Martinez-Salas E. 2012. Gemin5 proteolysis reveals a novel motif to identify L protease targets. *Nucleic acids research* 40:4942-4953.
- Rohn TT. 2010. The role of caspases in Alzheimer's disease; potential novel therapeutic opportunities. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death* 15:1403-1409.
- Roth KA. 2001. Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: causation, correlation, and confusion. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 60:829-838.
- Roubille F, et al. 2007. Myocardial expression of a dominant-negative form of Daxx decreases infarct size and attenuates apoptosis in an in vivo mouse model of ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 116:2709-2717.
- Ruiz-Torres P, Lucio J, Gonzalez-Rubio M, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D. 1997. Oxidant/antioxidant balance in isolated glomeruli and cultured mesangial cells. *Free Radic Biol Med* 22:49-56.
- Saeed U, Karunakaran S, Meka DP, Koumar RC, Ramakrishnan S, Joshi SD, Nidadavolu P, Ravindranath V. 2009. Redox activated MAP kinase death signaling cascade initiated by ASK1 is not activated in female mice following MPTP: novel mechanism of neuroprotection. *Neurotox Res* 16:116-126.
- Salomoni P, Guernah I, Pandolfi PP. 2006. The PML-nuclear body associated protein Daxx regulates the cellular response to CD40. *Cell Death Differ* 13:672-675.
- Salomoni P, Khelifi AF. 2006. Daxx: death or survival protein? *Trends Cell Biol* 16:97-104.
- Scott FL, Fuchs GJ, Boyd SE, Denault JB, Hawkins CJ, Dequiedt F, Salvesen GS. 2008. Caspase-8 cleaves histone deacetylase 7 and abolishes its transcription repressor function. *J Biol Chem* 283:19499-19510.
- Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. 2015. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ* 22:526-539.
- Sheydina A, Riordon DR, Boheler KR. 2011. Molecular mechanisms of cardiomyocyte aging. *Clinical science (London, England : 1979)* 121:315-329.
- Song J, Park KA, Lee WT, Lee JE. 2014. Apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1): potential as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci* 15:2119-2129.
- Song JJ, Lee YJ. 2003. Role of the ASK1-SEK1-JNK1-HIPK1 signal in Daxx trafficking and ASK1 oligomerization. *The Journal of biological chemistry* 278:47245-47252.
- . 2004. Daxx deletion mutant (amino acids 501-625)-induced apoptosis occurs through the JNK/p38-Bax-dependent mitochondrial pathway. *J Cell Biochem* 92:1257-1270.
- Su B, Yang YB, Tuo QH, Zhu BY, Lei XY, Yin W, Liao DF. 2007. Anti-apoptotic effects of probucol are associated with downregulation of Daxx expression in THP-1 macrophage. *Cardiovasc Drugs Ther* 21:37-45.
- Suh Y. 2002. Cell signaling in aging and apoptosis. *Mechanisms of ageing and development* 123:881-890.
- Tang J, Agrawal T, Cheng Q, Qu L, Brewer MD, Chen J, Yang X. 2013. Phosphorylation of Daxx by ATM contributes to DNA damage-induced p53 activation. *PloS one* 8:e55813.

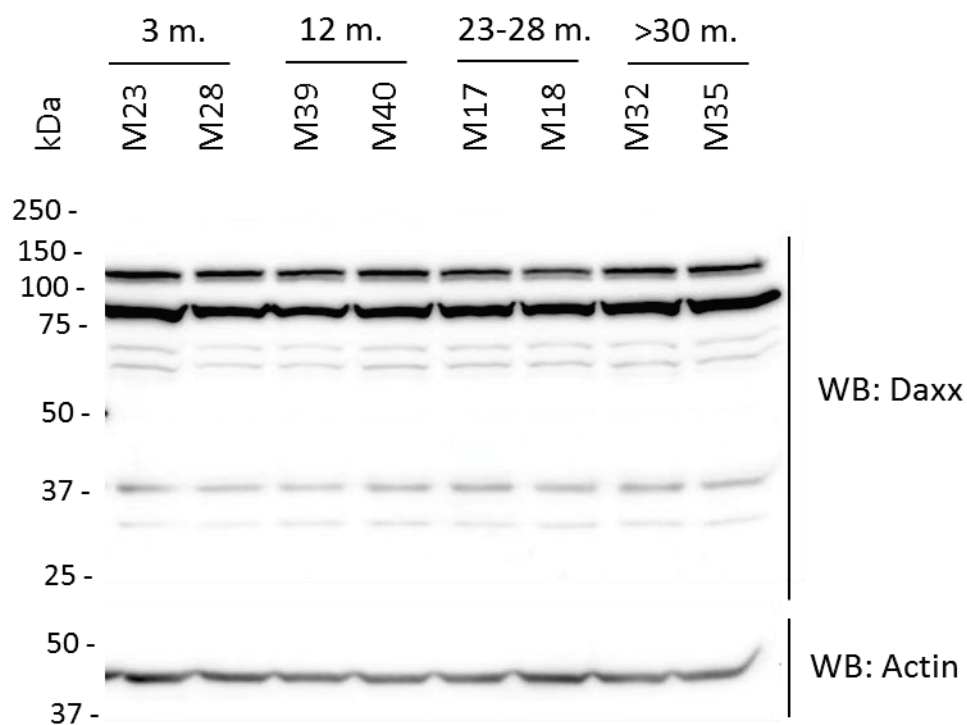
- Tang J, Qu LK, Zhang J, Wang W, Michaelson JS, Degenhardt YY, El-Deiry WS, Yang X. 2006. Critical role for Daxx in regulating Mdm2. *Nature cell biology* 8:855-862.
- Torii S, Egan DA, Evans RA, Reed JC. 1999. Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *EMBO J* 18:6037-6049.
- Ureshino RP, Bertoncini CR, Fernandes MJ, Abdalla FM, Porto CS, Hsu YT, Lopes GS, Smaili SS. 2010. Alterations in calcium signaling and a decrease in Bcl-2 expression: possible correlation with apoptosis in aged striatum. *J Neurosci Res* 88:438-447.
- Wren BG. 1992. The effect of oestrogen on the female cardiovascular system. *Med J Aust* 157:204-208.
- Wu S, Loke HN, Rehemtulla A. 2002. Ultraviolet radiation-induced apoptosis is mediated by Daxx. *Neoplasia* 4:486-492.
- Xu J, Kobayashi S, Yamaguchi S, Iijima K, Okada K, Yamashita K. 2000. Gender effects on age-related changes in brain structure. *AJNR Am J Neuroradiol* 21:112-118.
- Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. 1997. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89:1067-1076.
- Zhang C, Zhu Q, Hua T. 2010. Aging of cerebellar Purkinje cells. *Cell Tissue Res* 341:341-347.
- Zhang Y, Chong E, Herman B. 2002. Age-associated increases in the activity of multiple caspases in Fisher 344 rat organs. *Exp Gerontol* 37:777-789.
- Zhao LY, Liu J, Sidhu GS, Niu Y, Liu Y, Wang R, Liao D. 2004. Negative regulation of p53 functions by Daxx and the involvement of MDM2. *The Journal of biological chemistry* 279:50566-50579.
- Zhong S, Salomoni P, Ronchetti S, Guo A, Ruggero D, Pandolfi PP. 2000. Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J Exp Med* 191:631-640.
- Zobalova R, Swettenham E, Chladova J, Dong LF, Neuzil J. 2008. Daxx inhibits stress-induced apoptosis in cardiac myocytes. *Redox Rep* 13:263-270.



# Supplementary figures



**Supplementary figure 1. Western blot of DAXX in the kidney. a)** An example of DAXX immunoblot is presented of kidney samples. **b)** The protein loading reference is the Coomassie blue staining for all the peripheral organs.



**Supplementary figure 2. Western blot of DAXX in the cortex.** An example of DAXX immunoblot is presented of cortex samples. The protein loading reference is the protein expression of actin for all the brain regions.

**Supplementary table 1 Daxx antibodies and the detection of the hyperphosphorylated Daxx**

Compagny	Catalog number	Épitope	References
Covance	Not shown in the article	GST fusion protein of Daxx (amino acids 1–440)	(Michaelson, Bader et al. 1999, Ecsedy, Michaelson et al. 2003, Michaelson and Leder 2003)
Santa cruz	sc-7152	C-terminus of Daxx (627-739)	(Tang, Qu et al. 2006, Lalioti, Vergarajauregui et al. 2002, Lalioti, Vergarajauregui et al. 2009, Emelyanov, Kovac et al. 2002)
Santa cruz	sc-8043	C-terminus of Daxx (627-739)	(Lalioti, Vergarajauregui et al. 2002, Lalioti, Vergarajauregui et al. 2009)
Sigma	Not shown in the article	Not shown in the article	(Fukuyo, Kitamura et al. 2009)
Abcam	ab49287	248 amino acid sequence in the N-terminus of Daxx	(Michod, Bartesaghi et al. 2012)
Abcam	ab105173	Residues 300-400 of Daxx	This article
Novus	Not shown in the article	Not shown in the article	(Pineiro, Ramajo et al. 2012)
In house	N/A	C-terminus of Daxx (635-740)	(Hollenbach, Sublett et al. 1999, Hollenbach, McPherson et al. 2002)
In house	N/A	C-terminus of Daxx (625-740)	(Li, Wang et al. 2007)

## ARTICLE 2

### **Multiple caspases cleave STK3 and organ specific proteolytic STK3 fragments are observed in the aging process**

**Auteurs de l'article:** Mélissa Lessard-Beaudoin, Mélissa Laroche, Amal Loudghi, Marie-Josée Demers, Jean-Bernard Denault, Guillaume Grenier, Sean-Patrick Riechers, Erich E. Wanker and Rona K. Graham

**Statut de l'article:** Publié dans Neurobiology of aging

**Avant-propos:** Le travail expérimental sous-jacent à cet article a été entièrement effectué par moi-même à l'exception de la quantification de l'ARNm dans les régions cérébrales murines et de l'expression protéique de STK3 et des caspases dans le striatum ayant été effectué par Marie-Josée Demers, assistante de recherche dans le laboratoire de Pre Rona Graham, ainsi que l'analyse protéique de la caspase-7 qui a été réalisée par Amal Loudghi, stagiaire dans le laboratoire. Il est à noter que les échantillons tissulaires ont été majoritairement récoltés avant mon arrivée dans le laboratoire. J'ai rédigé entièrement cet article, sous les bons conseils de Pre Rona Graham et des coauteurs.

**Résumé :** Les fonctions de la serine/thréonine kinase 3 (STK3) sont encore à ce jour incertain en dépit des nombreuses recherches effectuées sur son homologue, STK4. Puisque la famille des STK est impliquée dans l'apoptose et que STK3 a récemment été identifié comme un substrat de la caspase-6, nous avons analysé l'expression et le clivage de STK3 dans des organes périphériques et régions cérébrales murins au cours du processus du vieillissement. Nous avons aussi analysé l'expression et l'activité de la caspase-3, -6 et -8 afin de caractériser les mécanismes potentiels sous-jacents à la génération des fragments de STK3 et leur relation avec l'apoptose. Nous avons démontré, pour la première fois, le clivage de STK3 par la caspase-7 et montré que l'expression protéique de STK3 augmente globalement à travers l'organisme entier avec le vieillissement. En revanche, l'expression et l'activité de la caspase-3, -6 et -8 varient fortement selon l'organe analysé suggérant un effet différentiel du vieillissement sur les mécanismes apoptotiques et/ou sur les fonctions non apoptotiques des caspases à travers l'organisme. Ces résultats approfondissent notre compréhension du rôle des caspases et de leurs substrats dans le processus de vieillissement normal et mettent en lumière le rôle potentiel de STK3 dans la neurodégénérescence.

## **Organ specific alteration in caspase expression and STK3 proteolysis during the aging process**

Mélissa Lessard-Beaudoin<sup>1,2</sup>, Mélissa Laroche<sup>1,2</sup>, Amal Loudghi<sup>1,2</sup>, Marie-Josée Demers<sup>1,2</sup>, Jean-Bernard Denault<sup>2,4,5</sup>, Guillaume Grenier<sup>3,4</sup>, Sean-Patrick Riechers<sup>6</sup>, Erich E. Wanker<sup>6</sup> and Rona K. Graham<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Research Centre on Aging

<sup>2</sup>Dept. of Pharmacology and Physiology

<sup>3</sup>Dept. of Orthopaedic Surgery

<sup>4</sup>CHUS Research Center

<sup>5</sup>Institut de Pharmacologie de Sherbrooke

University of Sherbrooke, Sherbrooke, Faculty of Medicine and Health Sciences, Quebec, Canada, J1H 5N4.

<sup>6</sup>Max Delbrück Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch, 13125 Berlin, Germany.

### **\*Corresponding Author:**

Rona K. Graham, Ph.D.

Dept. Pharmacology and Physiology

Faculty of Medicine and Health Sciences

University of Sherbrooke

3001 12e Avenue Nord

Sherbrooke, QC, J1H 5N4

Tel: 819-346-1110 x16813

Fax: 819-564-5399

Email: Rona.Graham@USherbrooke.ca

**Key words:** Aging, apoptosis, caspases, serine/threonine kinase 3, peripheral organs, brain region.

**Abstract**

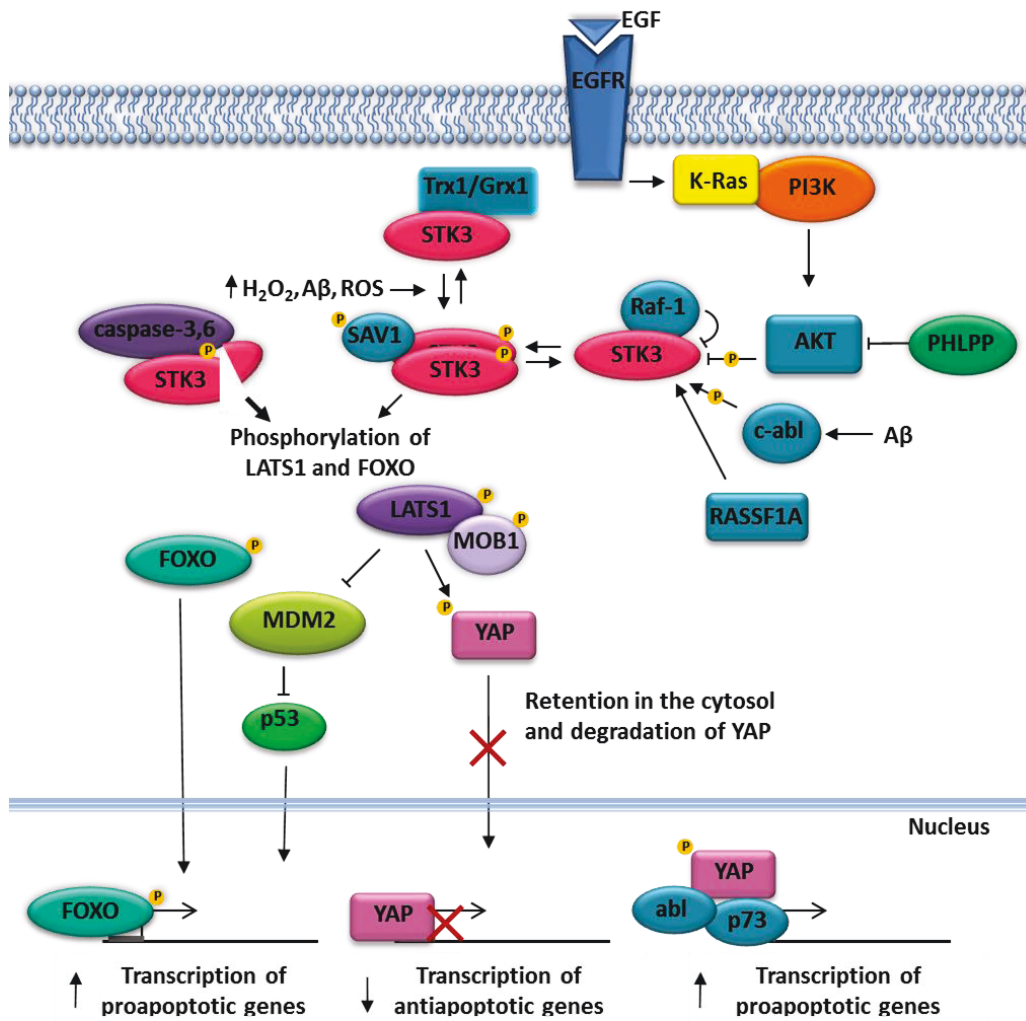
Caspases and their substrates are key mediators of apoptosis and strongly implicated in various physiological processes. As the STK family is involved in apoptosis, and STK3 is a recently identified caspase-6 substrate, we assessed the expression and cleavage of STK3 in murine peripheral organs and brain regions during the aging process. We also assessed caspase-3, -6, -7 and -8 expression and activity in order to delineate potential mechanism(s) underlying the generation of the STK3 fragments observed, and their relation to the apoptotic pathway. We demonstrate for the first time the cleavage of STK3 by caspase-7 and show that STK3 protein levels globally increase throughout the organism with age. In contrast, caspase-3, -6, -7 and -8 expression and activity vary significantly amongst the different organs analyzed suggesting differential effects of aging on the apoptotic mechanism and/or non-apoptotic functions of caspases throughout the organism. These results further our understanding of the role of caspases and their substrates in the normal aging process and highlight a potential role for STK3 in neurodegeneration.

## Introduction

Caspases are cysteinyl peptidases that are activated by proteolysis and dimerization. This leads to cleavage of their substrates and ultimately cell death through the programmed cell death pathway. The caspase family is essential not only for cell death, but also for immunity, neurogenesis, synaptic activity, cell proliferation and differentiation (D'Amelio *et al.*, 2010, Kuranaga & Miura, 2007, Schwerk & Schulze-Osthoff, 2003). Activation of caspases is observed in many physiological and pathological processes including Alzheimer disease, Huntington disease, stroke and aging (Broughton *et al.*, 2009, Graham *et al.*, 2011a, LeBlanc, 2013, Lee & Kim, 2006, Pattison *et al.*, 2006, Snigdha *et al.*, 2012). The expression levels and activity of caspases during the aging process is organ and tissue specific. For instance, in the cerebral cortex of Wistar rats, caspase-3 (CASP3) protein expression decreases with aging whereas caspase-8 (CASP8) increases from 12 months of age onwards (Shimohama *et al.*, 2001). In contrast to the cortex, CASP3 expression levels do not change in the skeletal muscle of aged Fischer 344/Brown Norway rats compared to their younger counterparts (Chung & Ng, 2006).

The serine/threonine kinase 3 (STK3), also known as STE-20-like kinase MST2 (MST2), is a 56 kDa protein in the germinal center kinase group II of the MAPK (mitogen-activated protein kinase) family and is involved in apoptosis, differentiation, and proliferative signalling (Heallen *et al.*, 2011, Kim *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2013, Liu, Wu, *et al.*, 2012, Oh *et al.*, 2009, Qin *et al.*, 2013). This pathway is often referred to as the signalling pathway of its ortholog in *Drosophila melanogaster*, the Hippo signalling pathway. The activation of STK3 leads to the phosphorylation of Mps Once kinase activator-like 1 (MOB1), Large tumor suppressor 1 and 2 (LATS1/2) and Yes-associated protein (YAP). This results in the cytoplasmic retention and degradation of YAP, inhibiting the latter from promoting the

transcription of proliferative genes such as c-myc and cyclin E via the transcription factor Scalloped/TEAD. STK3 also mediates the phosphorylation of the FOXO transcription factor family leading to the transcription of proapoptotic genes such as FasL, Trail and PUMA (Liu, Wong, *et al.*, 2012) (**Fig. 1**).



**Figure 1. STK3 pathway.** In the presence of oxidative stress, glutaredoxine (Grx1) and thioredoxine (Trx1) dissociates from STK3 promoting its activation by autophosphorylation. STK3 is also activated indirectly by the EGFR via PI3K/Akt signaling. The phosphorylation cascade promoted by STK3 activation results in a downregulation of proliferative genes via the degradation of Yes-associated protein (YAP). The cascade also upregulates proapoptotic genes by the phosphorylation of YAP and the phosphorylation of FOXO transcription factor. STK3 activity is decreased by the phosphatases (PP1 and PP2A) and Raf-1 and increased by RASSF1A, c-abl and its cleavage by caspase-3 which produces a constitutively active fragment that is resistant to dephosphorylation.



The two main post-translational modifications known to regulate STK3 activity are phosphorylation and caspase-mediated cleavage. STK3 can homodimerize or heterodimerize with its homolog STK4 (MST1) allowing its activation by autophosphorylation whereas the protein phosphatase 1 and 2A (PP1 and PP2A) inactivate it (Deng *et al.*, 2003b). STK3 is also regulated by CASP3 cleavage, which results in the production of 34 kDa N-terminal fragments (Deng *et al.*, 2003b, Lee *et al.*, 1998). These fragments are resistant to dephosphorylation by protein phosphatases (Deng *et al.*, 2003b) and conserve kinase activity. We have recently shown that STK3 is a caspase-6 (CASP6) substrate (Riechers *et al.*, 2016a) and a multiple sequence alignment of STK3 demonstrates that the caspase cleavage sites V63EID and D319ELD are conserved down to *C. elegans* and *A. gambia*, respectively, suggesting important roles for the fragments generated. The caspase substrate STK4 is cleaved by CASP3, 6 and 7 (O'Neill *et al.*, 2005).

The majority of the work on STK3 has been made during development. However, the increase of caspase activity and production of reactive oxygen species (ROS) in neurodegenerative diseases and during aging, suggest that the production of STK3 fragments may play a role in neurodegeneration (Merksamer *et al.*, 2013, Patten *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2003, Graham *et al.*, 2011a). We have previously shown that in striatal cells expressing mutant huntingtin the level of STK3 and its fragments are increased compared to controls (Riechers *et al.*, 2016a).

In order to gain a better understanding of apoptotic mechanisms and the role of STK3 in aging throughout the organism, we characterized the mRNA, and protein expression of STK3 in the normal aging process in peripheral organs and brain regions of C57BL/6 male mice. Moreover, we assessed the expression and activity levels of CASP3, 6, 7 and 8 in

order to further our understanding of the potential mechanism(s) underlying the in vivo generation of STK3 fragments and their relation to the programmed cell death pathway.

## **Material and methods**

### **Animals**

Peripherals organs and brain regions were collected as described previously from C57BL/6 male mice and grouped according to age: 3-4 months, 12 months, 23-28 months and older than 30 months (Lessard-Beaudoin *et al.*, 2015). The animal care and ethics committee of University of Sherbrooke approved the protocols for this study (protocols 303-12 and 133-14B). The mice were anaesthetized (Isoflurane, Abbott) and euthanized by cervical dislocation. The upper part of the cranium was removed, and the brain was collected. The cortex, cerebellum, striata and hippocampi were then dissected. In parallel, kidney, liver, heart and spleen were harvested.

### **Western blot analyses**

Peripheral organs and brain regions were homogenized and sonicated in lysis buffer (0.32 mM Sucrose, 20 mM Tris pH 7.2, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA pH 7.2) using a cocktail of protease inhibitors (Roche), 4.2 mM PefaBloc SC (Roche) and 10 µM Z-VAD-fmk (Enzo Life Sciences) and clarified by centrifugation at 13,000 rpm. The protein concentration was determined using the BCA protein assay kit (Pierce). Protein lysates (50 µg) were separated on a 7.5% or 10% SDS-PAGE gel and transferred to a PVDF membrane (PerkinElmer). The membranes were probed with anti-STK3 (ab52641, Abcam, 1:1000), anti-CASP3 (9662, Cell signalling, 1:1000), anti-CASP6 (9762, Cell signalling, 1:500), anti-CASP7 (9492, Cell signalling, 1:1000), anti-CASP8 (9746, Cell signalling, 1:1000) or anti-actin (MAB1501, Millipore, 1:10000) antibodies. Peroxidase activity was

detected and densitometric values were obtained with the Odyssey Fc imaging system (Mandel) using Luminata Crescendo Western HRP substrate (Millipore). Quantification of  $\beta$ -actin or Coomassie staining was used to standardize the amount of protein in each lane depending on the protein stability in each organ and densitometric values obtained with the Odyssey Fc imaging system (Mandel).

### **Real-Time Quantitative RT-PCR**

Total RNA was extracted from peripheral organs and brain regions with the RNeasy mini kit (QIAGEN) and cDNAs were prepared using ProtoScript Reverse Transcriptase II (#M0368X, New England BioLabs). Quantification was done using Mx3005P QPCR Systems (Stratagene) with mouse-specific  $\beta$ -actin primers (forward 5'-ACGGCCAGGTCATCACTATTG-3'; reverse 5'-CAAGAAGGAAGGCTGGAAAAGA-3'), STK3 primers (Forward 5'-AGGCCCTATGTCCAACAGTG-3' and Reverse 5'-CCATCATGGGGTCTAGTGCT-3'), CASP3 Primers (Forward 5'-TGTCATCTCGCTCTGGTACG-3' and reverse 5'-TCCCATAAATGACCCCTTCA-3'), CASP6 primers( Forward 5'-TGGCTCCTGGTACATTCAGGAT-3' and reverse 5'-TCCGTGAACTCCAGGGAAGT-3') and CASP8 primers( Forward 5'-CCTAGACTGCAACCGAGAGG-3' and reverse 5'-GCAGGCTCAAGTCATCTTCC-3'). Amplification of  $\beta$ -actin was used to standardize the amount of sample RNA in the reaction. Gene-expression levels were measured using MxPro QPCR Software (Stratagene).

### **Caspase cleavage assays**

Recombinant caspases were expressed, purified and characterized as described elsewhere (Boucher *et al.*, 2014). Caspases were diluted in a reaction buffer (100 mM Hepes pH 7.4, 200 mM NaCl, 0.2% CHAPS, 2 mM EDTA, 20% glycerol) at a concentration of 2000 nM

and serially diluted. Final concentrations used for each caspase in the assay were 0, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, and 1000 nM. The diluted recombinant caspases and 50 µg of brain lysate were pre-heated separately at 37 °C for 30 min, then mixed and incubated for 90 min at 37 °C. Immunoblotting was performed as described above.

### **Caspase activity assays**

Murine tissues were homogenized as described above without caspases inhibitors and the lysates diluted with reaction buffer (100 mM Hepes pH 7.4, 200 mM NaCl, 0.2% CHAPS, 2 mM EDTA, 20% glycerol and 20% DTT). The activity of endogenous CASP3, 6 and 8 was measured in the lysates using the preferred fluorogenic substrates AcDEVD-AFC, AcVEID-AFC and AcIETD-AFC, respectively (Enzo Life sciences) at 37°C for 60 min. It is noted that AcDEVD-Afc is also the preferred substrate of CASP7, and that no small peptidic substrate is specific to a particular caspase (McStay *et al.*, 2008). The fluorescence generated was measured by the VICTOR X Multilabel Plate Readers spectrophotometer (PerkinElmer).

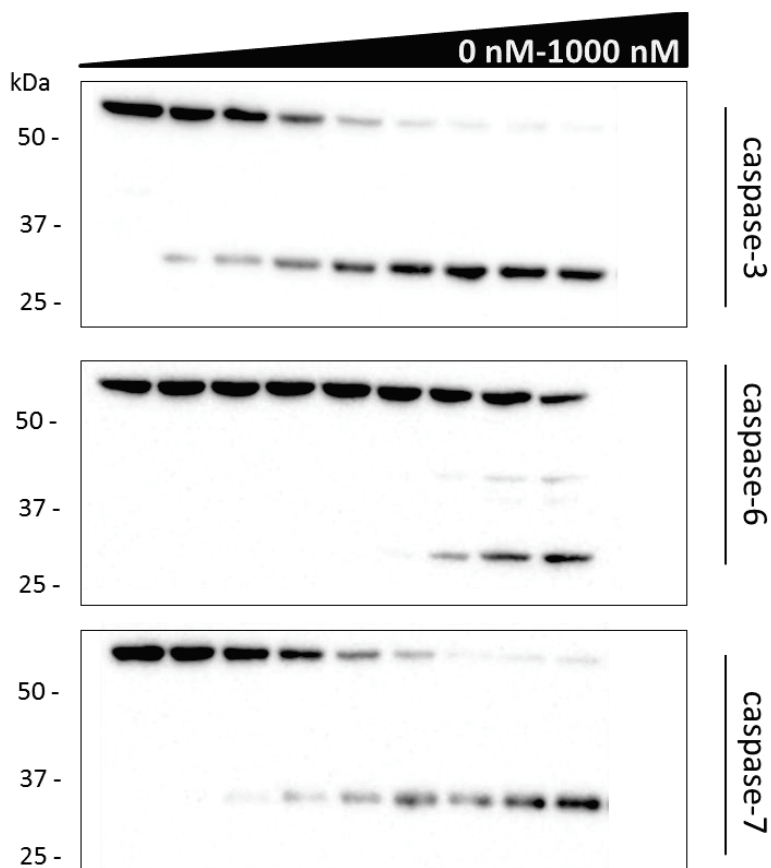
### **Statistical analysis**

Student *t* test, one-way ANOVA and the post hoc Tukey's multiple comparison tests were used for analysis between the age groups. The statistical significance was established at 0.05 (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ). GraphPad Prism 6.0 software was used for all statistical analysis (GraphPad Software, La Jolla, CA).

## Results

### Differential cleavage of STK3 by CASP3, 6 and 7

As STK4 is differentially cleaved by CASP3, 6 and 7 producing fragments with specific functions, we assessed the cleavage of STK3 by these caspases (Song & Lee, 2008). Murine brain lysate was incubated with active-site titrated recombinant CASP3, 6 or 7, and STK3 cleavage was assessed. As expected, CASP3 and CASP6 cleave STK3 (Riechers *et al.*, 2016a, Lee *et al.*, 2001). However, we also observed cleavage by CASP7 and noted that the caspases do not cleave STK3 with the same efficacy and do not produce the same fragment sizes. A higher concentration of CASP6 or 7 is required to cleave STK3 and generate the 34 kDa fragment when compared to CASP3. Interestingly, CASP6 is the only caspase that generates the 39 kDa STK3 fragment (**Fig. 2**).

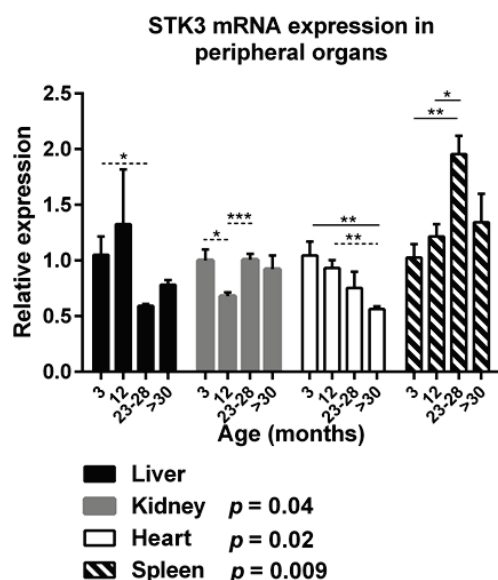


**Figure 2. STK3 is cleaved by caspase-3, 6 and 7.** Brain lysate was incubated with serial dilutions of recombinant caspase-3, 6 or 7 and analyzed by immunoblotting. The concentration of caspases from lane 1 to 9 are 0, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 nM respectively. STK3 is cleaved by all the executioner caspases albeit with varying efficacies (caspase-3 > caspase-7 > caspase-6).

### Region specific alterations in STK3 expression with aging in peripheral organs

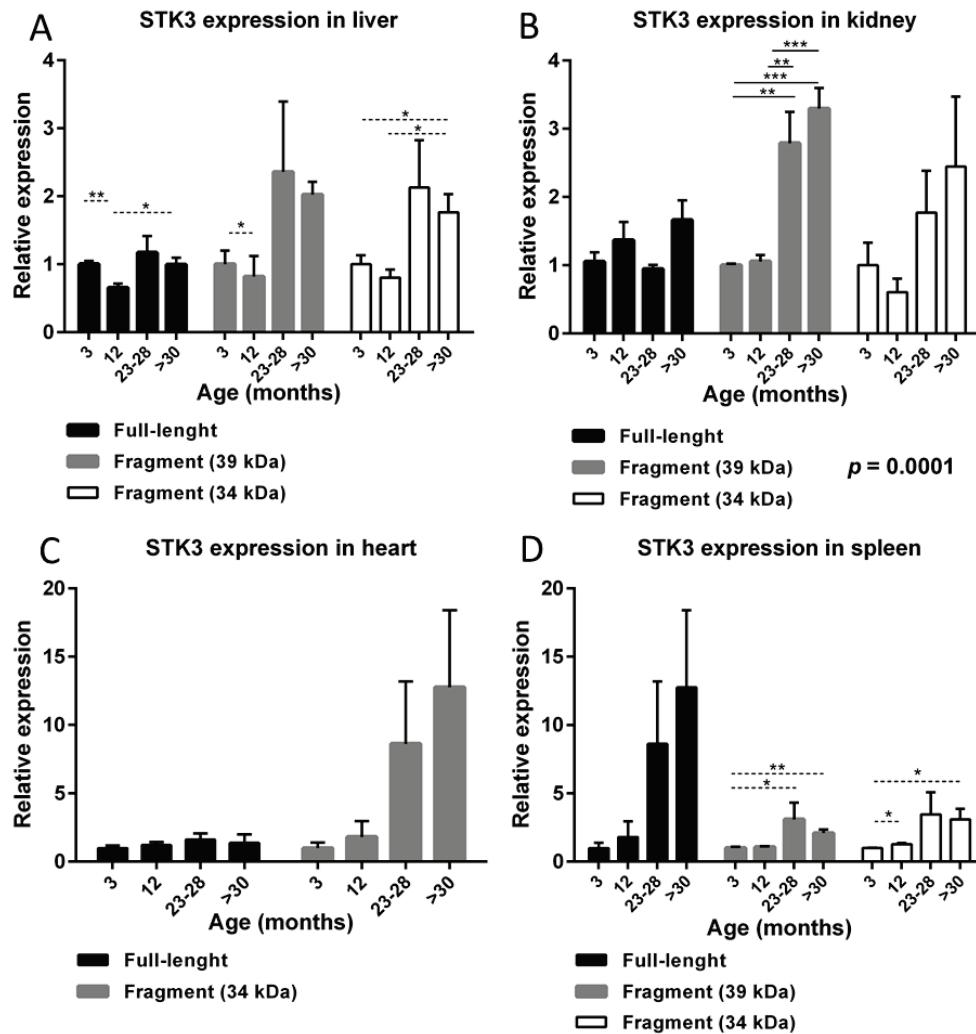
As the STK family is involved in multiple physiological processes, we assessed the mRNA and protein expression of STK3 and its fragments during the aging process. In the heart, a significant decrease in STK3 mRNA expression is observed by >30 months. In contrast, while there is a significant decrease in STK3 mRNA in the kidney at 12 months of age, it then increases after 23-28 months (**Fig. 3**). No significant difference in STK3 mRNA expression is observed with aging in the liver (ANOVA test). However, the mRNA expression decreases significantly (43%) at 23-28 months of age in the liver (*t* test). In

contrast to the heart and the kidney, STK3 mRNA expression level increases significantly (47%) in the spleen with aging till 23-28 months of age (**Fig. 3**).



**Figure 3. STK3 mRNA expression levels in peripheral organs.** STK3 mRNA expression levels tends to decrease at 23-28 months of age in the liver (t test: 3 months vs. 23-28 months,  $p < 0.05$ ). In the kidney and the heart, STK3 mRNA decreases with aging (Kidney: ANOVA  $p = 0.04$ , t test: 3 months vs. 12 months,  $p < 0.05$ ; 12 months vs. 23-28 months,  $p < 0.001$ ; Heart: ANOVA  $p = 0.02$  *post hoc*: 3 months vs. 30 months,  $p < 0.01$ ; t test: 12 months vs.  $> 30$  months,  $p < 0.01$ ). In contrast to the other peripheral organs, an increase of STK3 mRNA expression level is observed with the aging in the spleen (ANOVA  $p = 0.009$ , *post hoc*: 3 months vs. 23-28 months,  $p < 0.01$ ; 12 months vs. 23-28 months,  $p < 0.05$ ).  $n = 5$  by age-group. Tukey's *post hoc* are presented on the graphs with a continuous line and t test are presented on the graphs with dotted line.

Overall, no significant change in STK3 protein expression levels is observed in the liver with aging (ANOVA). However, comparing the groups using *t*-test shows that STK3 FL protein levels decrease initially from 3 to 12 months of age then increase at  $> 30$  months of age when compared to the 12 months values (**Fig. 4A**). The STK3 39 kDa fragment expression levels in the liver also decrease at 12 months of age whereas the 34 kDa STK3 fragment expression increases by 76% at  $> 30$  months of age when compared to 3 and 12 months age-group (**Fig. 4A**). In the kidney, a 3-fold increase is observed for the STK3 39 kDa fragment expression after the age of 12 months (**Fig. 4B**). While no significant variation in STK3 protein expression is observed in the heart, a positive correlation is observed in the STK3 34 kDa fragment with age (**Fig. 4C**). No significant variation in STK3 FL protein expression level is observed in the spleen, however a 2 to 3-fold increase is observed in STK3 39 kDa and 34 kDa fragments suggesting an increase in STK3 cleavage occurs with age in the spleen (**Fig. 4D**).



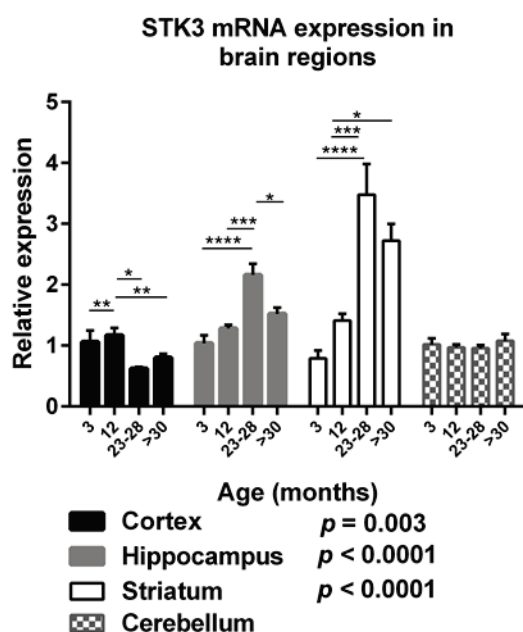
**Figure 4. Global increase of STK3 protein expression levels in peripheral tissues.** A) The FL form of STK3, and the 34 kDa fragment increase in the liver with age (FL: t test: 3 months vs. 12 months,  $p < 0.01$ ; 12 months vs. >30 months,  $p < 0.05$ ; 39 kDa: t test: 3 months vs. 12 months,  $p < 0.05$ ; 34 kDa: t test: 3 months vs. >30 months,  $p < 0.05$ ; 12 months vs. >30 months,  $p < 0.05$ ). B) No change in FL STK3 is observed in the kidney. In contrast, the STK3 39 kDa fragment increases in the kidney from 23-28 months of age (ANOVA  $p = 0.0001$ , *post hoc*: 3 months vs. 23-28 months,  $p < 0.01$ ; 3 months vs. >30 months,  $p < 0.001$ ; 12 months vs. 23-28 months,  $p < 0.01$ ; 23-28 months vs. >30 months,  $p < 0.001$ ). C) No significant variation in STK3 protein expression level is observed in the heart. However, an increasing linear trend is observed in the 34 kDa fragment ( $p = 0.0255$ ). D) No change in FL STK3 is observed in the spleen with age. However, STK3 39 kDa and 34 kDa fragment expression level increase with aging in the spleen (39 kDa: t test: 3 months vs. 23-28 months,  $p < 0.05$ ; 3 months vs. >30 months,  $p < 0.01$ ; 34 kDa: t test: 3 months vs. 12 months,  $p < 0.05$ ; 3 months vs. >30 months,  $p < 0.05$ ).  $n = 4$  by age-group. Tukey's *post hoc* are presented on the graphs with a continuous line and t test are presented on the graphs with dotted line.

### Region-specific variations in STK3 expression in the brain with aging

STK3 mRNA expression increases by 68% at 12 months of age in the cortex then decreases after 23 months of age. Hippocampal STK3 mRNA expression increases up to 23-28



months of age then decreases at >30 months of age. In the striatum, the mRNA expression levels of STK3 increase with aging (76%). In the cerebellum, no age dependent effects are observed (**Fig. 5**).



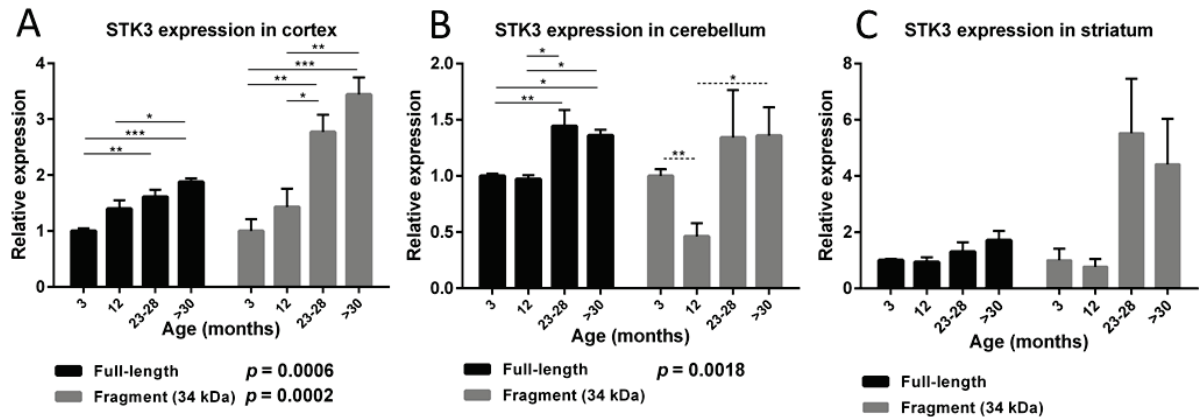
**Figure 5. Global increase of STK3 mRNA expression levels in the brain** STK3 mRNA expression increases initially then decreases with age in the cortex and the hippocampus (Cortex: ANOVA  $p=0.003$ , *post hoc*: 3 months vs. 12 months,  $p<0.01$ ; 12 months vs. 23-28 months,  $p<0.05$ ; 12 months vs. >30 months,  $p<0.01$ ; Hippocampus: ANOVA  $p<0.0001$ , *post hoc*: 3 months vs. 23-28 months,  $p<0.0001$ ; 12 months vs. 23-28 months,  $p<0.001$ ; 23-28 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ). An increase in striatal STK3 mRNA expression level is observed with age. In contrast, no significant variation are observed in the cerebellum (Striatum: ANOVA  $p<0.0001$ , *post hoc*: 3 months vs. 23-28 months,  $p<0.0001$ ; 12 months vs. 23-28 months,  $p<0.001$ ; 12 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ).  $n=5$  by age-group.

In the cortex and the cerebellum, both the STK3 FL and the 34 kDa fragment forms increase significantly during the aging process (**Fig. 6A-B**). In contrast to other brain regions, no significant variation in the STK3 protein expression is observed in the striatum with age. However, a positive correlation is observed for the STK3 34 kDa fragment (**Fig. 6C**).

#### Differential expression and activity of caspases in peripheral organs with aging

In the liver, CASP6 and 8 mRNA expression levels decrease at 23-28 months of age. In contrast, an increase in mRNA expression of CASP3 and 6 is observed in the kidney after the age of 12 months. Similar to the liver, mRNA expression level of all caspases analyzed

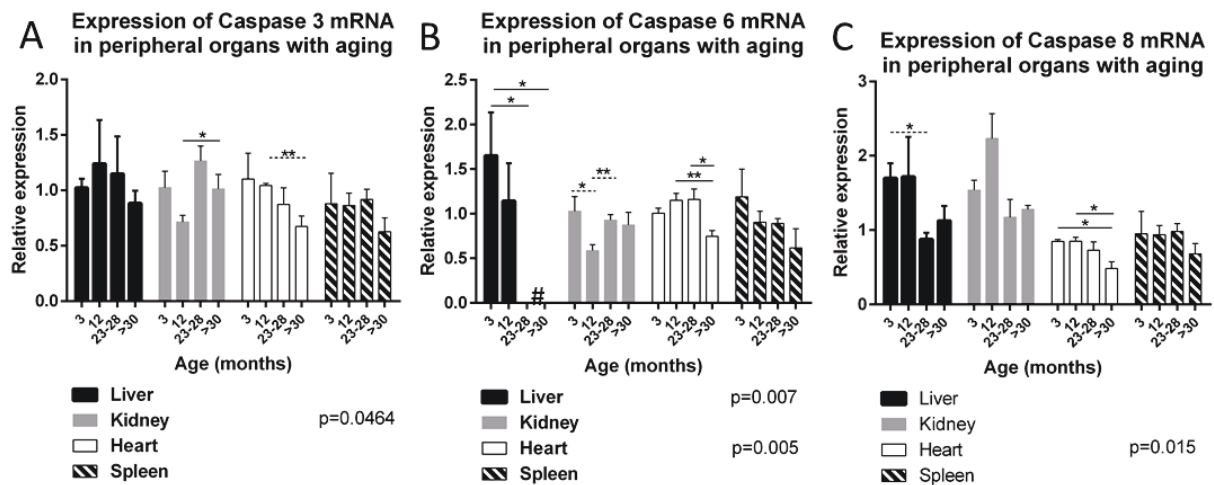
decreases at >30 months of age in the heart. No significant variation in any caspases is observed in the spleen with age (**Fig. 7**).



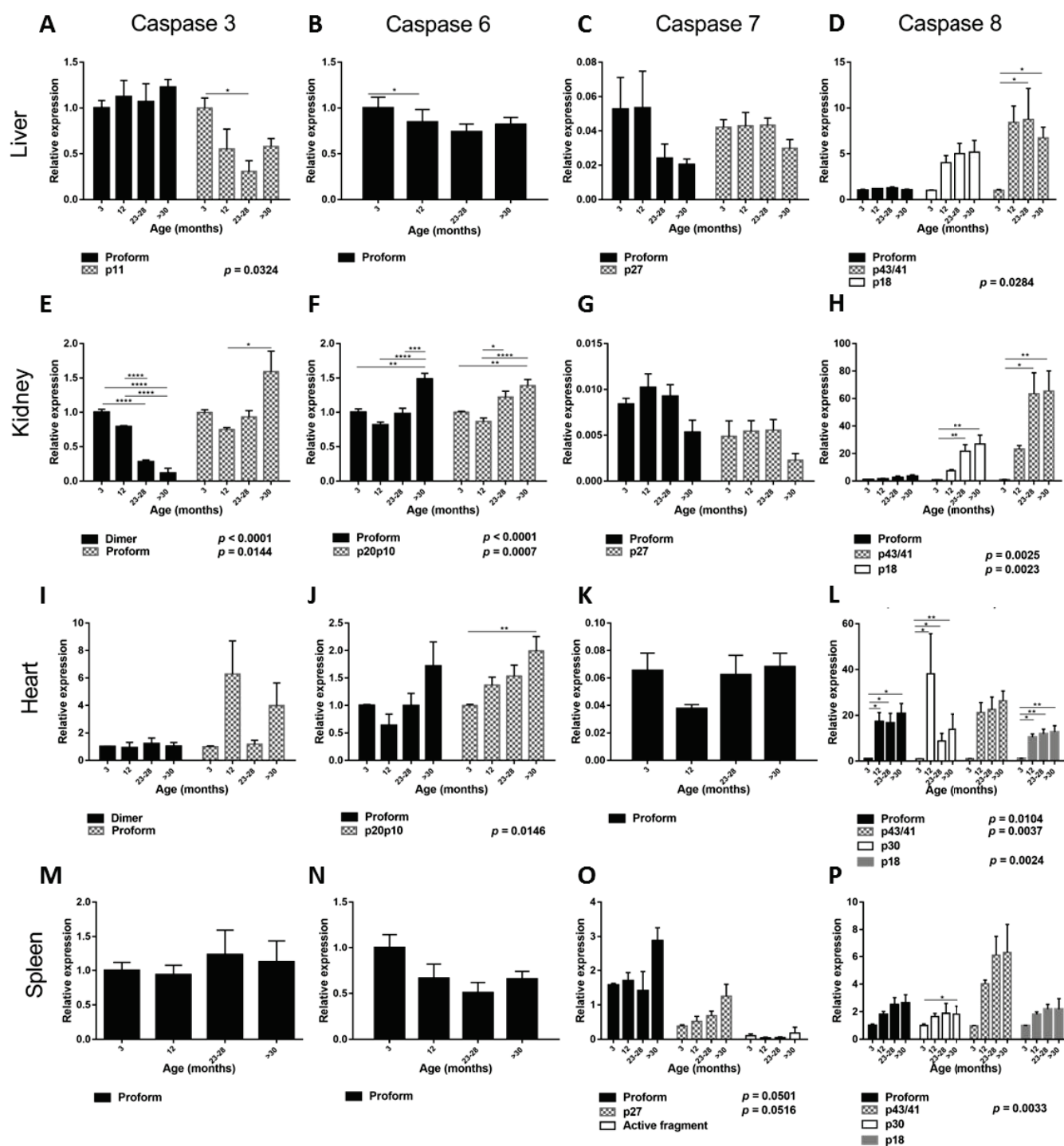
**Figure 6. Global increase of STK3 protein expression levels in the brain A,B)** STK3 protein expression level increases in the cortex and the cerebellum with age (A (FL): ANOVA  $p=0.0006$ , *post hoc*: 3 months vs. 23-28 months,  $p<0.01$ ; 3 months vs. >30 months,  $p<0.001$ ; 12 months vs. >30 months,  $p<0.01$ ; A (34 kDa): ANOVA  $p=0.0002$ , *post hoc*: 12 months vs. 23-28 months,  $p<0.05$ ; 3 months vs. 23-28 months,  $p<0.01$ ; 3 months vs. >30 months,  $p<0.001$ ; 12 months vs. >30 months,  $p<0.01$ ; B (FL): ANOVA  $p=0.0018$ , *post hoc*: 3 months vs. 23-28 months,  $p<0.01$ ; 3 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ; 12 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ; 12 months vs. >23-28 months,  $p<0.05$ ; B (34 kDa): t test: 3 months vs. 12 months,  $p<0.01$ ; 12 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ). C) No significant variation is observed in the FL form of STK3 in the striatum. However, the 34 kDa fragment tends to increase with age (ANOVA  $p=0.0509$ ,  $r^2=0.316$   $p=0.02$ ).  $n=4$  by age-group. Tukey *post hoc* are presented on the graphs. FL= full-length.

With regards to caspase protein expression levels, cleaved (active) CASP3 and CASP6 proform expression decrease and no significant variation in CASP7 protein level is observed in the liver with the aging (**Fig. 8A, 8B**). In contrast, a ~5 fold increase of all protein forms of casp8 is observed in the liver after 3 months of age (**Fig. 8D**). In the kidney, the CASP3 zymogen (inactive form) significantly increases (54%) with age (**Fig. 8E**). A global increase in CASP6 and cleaved CASP8 expression levels is also observed in the kidney with aging (**Fig. 8F, 8H**). Interestingly, a 65-fold increase is observed in the CASP8 cleaved p43/41 form and a 26-fold increase is observed in cleaved CASP8 fragment in the kidney (**Fig. 8H**). Of note, and dissimilar to the other caspases, CASP7

expression level tends to decrease with age in the kidney (**Fig. 8G**). In contrast to the liver and the kidney, no significant variation is observed for CASP3 with aging in the heart and the spleen (**Fig. 8G, 8J**). However, in the heart, the CASP6 cleaved subunits (p20p10) increases by 99% and CASP7 proform decreases at 12 months of age (**Fig. 8J, 8K**). A 25-30-fold increase is also observed in CASP8 protein expression levels in the heart (**Fig. 8L**). Similar to the liver, CASP6 protein expression level decreases at 12 months of age in the spleen whereas all protein forms of CASP8, CASP7 proform and p27 subunit demonstrate increased expression with age in the spleen (**Fig. 8N, 8O, 8P**).



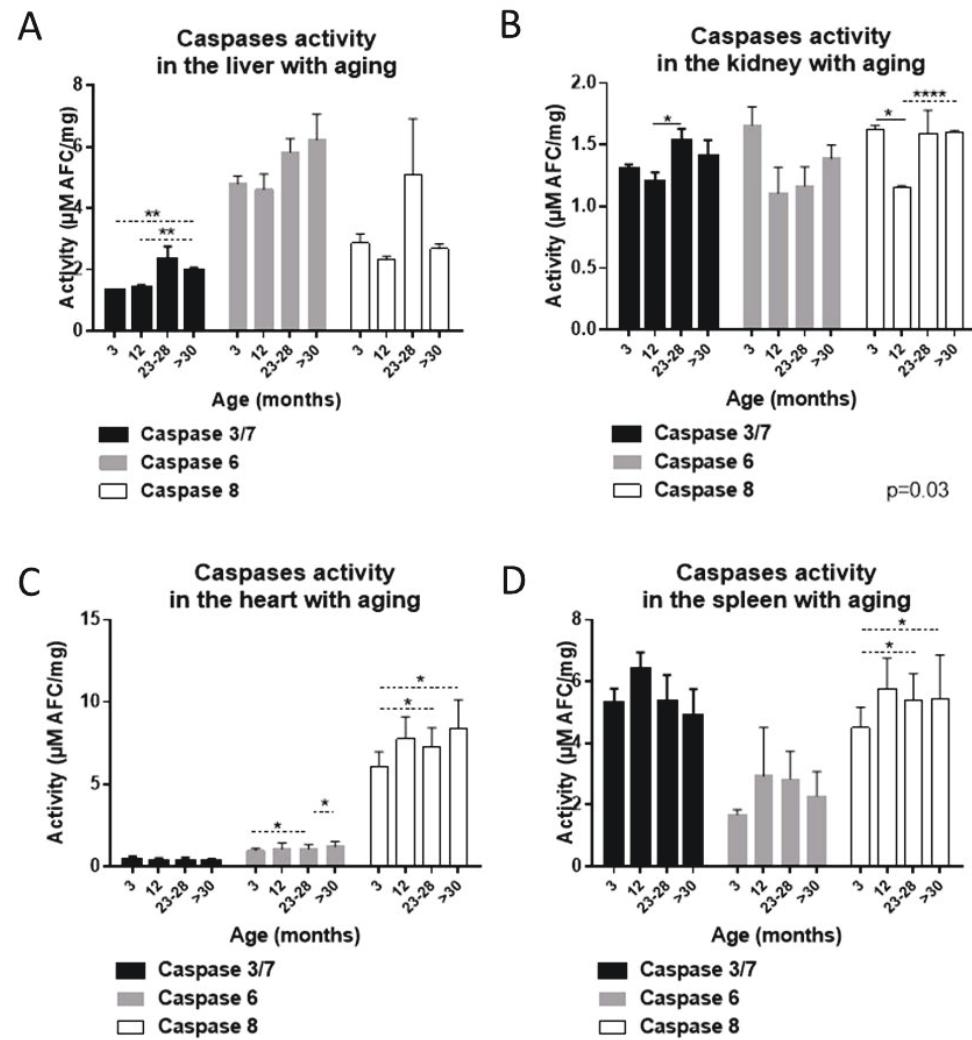
**Figure 7. Overall caspase mRNA expression levels decrease in peripheral tissues with aging.** **A)** Caspase 3 mRNA expression increases in the kidney and tends to decrease with aging in the heart (Kidney: ANOVA  $p=0.04$ , *post hoc*: 12 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ; Heart: *t* test: 12 months vs. >30 months,  $p<0.01$ ). No significant variation is observed in the liver and the spleen. **B)** Caspase-6 mRNA expression level decreases in the liver and the heart with age (Liver: ANOVA  $p=0.007$ , *post hoc*: 3 months vs. 23-28 months,  $p<0.05$ ; 3 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ; Heart: ANOVA  $p=0.005$ , *post hoc*: 12 months vs. >30 months,  $p<0.01$ ; 23-28 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ). In contrast, CASP6 mRNA tends to decrease at 12 months of age then increase at 23-28 months of age in the kidney (*t* test: 3 months vs. 23-28 months,  $p<0.05$ ; 12 months vs. >30 months,  $p<0.01$ ). **C)** Caspase 8 mRNA expression decreases in the heart and a trend decrease is observed in the liver with age (Liver: 12 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ; Heart: ANOVA  $p=0.015$ , *post hoc*: 3 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ; 12 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ). No significant variation in CASP8 mRNA is observed in the kidney and the spleen.  $n=5$  by age-group. Tukey's *post hoc* are presented on the graphs with a continuous line and *t* test are presented on the graphs with dotted line. # No Ct is detected for the 23-28 and >30 months group for CASP6.



**Figure 8. Caspase protein expression levels vary with aging in peripheral organs. A, B, C, D)** The p11 caspase-3 fragment and caspase-6 proform decrease, all forms of caspase-8 increase and no significant variation is observed with caspase 7 in the liver with aging (A (fragment): ANOVA  $p=0.03$ ; B: t test: 12 months vs. 23-28 months,  $p<0.05$ ; D (proform): t test: 3 months vs. 23-28 months  $p<0.05$ ; D (p43/41): t test: 3 months vs. 12 months  $p<0.001$ ; 3 months vs. >30 months,  $p<0.01$ ; D (p18): ANOVA  $p=0.03$ ) **E)** In the kidney, the caspase-3 proform increases with age (ANOVA  $p=0.014$ ) **F, G, H, J, K, L)** A global increase in caspase-6 and caspase-8 protein levels and a trend decrease in caspase-7 protein levels are observed in the kidney and the heart with aging (F (Proform): ANOVA  $p<0.0001$ ; F (p20p10): ANOVA  $p=0.0007$ ; G (Proform): t test: 12 months vs >30 months,  $p=0.0502$ ; 23-28 months vs >30 months,  $p=0.07$ ; G (p27): t test: 12 months vs >30 months,  $p=0.0582$ ; 23-28 months vs >30 months,  $p=0.053$ ; H (proform): t test: 3 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ; H (p43/41): ANOVA  $p=0.0025$ ; H (p18): ANOVA  $p=0.002$ ; J (p20p10): ANOVA  $p=0.0146$ ; K (Proform): 3 months vs. 12 months,  $p<0.05$ ; L (proform): ANOVA  $p=0.0104$ ; L (p43/41): ANOVA  $p=0.0037$ ; L (p18):  $p=0.002$ ). **I, M)** No significant variation is observed in caspase-3 protein expression levels with aging in the heart and the spleen. **N, O)** Caspase-6 protein expression level decrease in the spleen at 12 months of age (Proform: ANOVA,  $p=0.0501$ ; t test: 3 months vs. 12 months,  $p<0.05$ ; t test: 3 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ; 12 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ; O (p27) and caspase-7 protein levels increase at >30 months of age (N (Proform): ANOVA,  $p=0.0516$ ; t test: 3 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ; 23-28 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ) **P)** Similar to the other peripheral organs, caspase-8 protein expression level increases with age in the spleen ( P (proform): t test: 3 months vs. 12 months  $p<0.05$ ; 3 months vs. 23-28 months  $p<0.05$ ; 3 months vs. >30 months  $p<0.05$ ; P (p43/41): ANOVA  $p=0.003$ ; P (p30): t test: 3 months vs. 12 months  $p<0.05$ ; P (p18): t test: 3 months vs. 12 months  $p<0.01$ ).  $n=4$  by age-group .Tukey's *post hoc* are presented on the graphs.

An increase is observed in CASP3/7 activity in the liver with aging. No significant variation is observed in CASP6 and 8 activities (**Fig. 9A**). In the kidney, CASP3/7 activity increase at 23-28 months of age while CASP8 activity shows a clear decrease at 12 months of age however than increases at >30 months of age (**Fig. 9B**). An increase in CASP6 and 8 activities is observed in the heart with aging whereas no significant variation is observed for CASP3/7 activity. Similarly, CASP8 activity increases with aging in the spleen (**Fig. 9C-D**). No significant variation is observed in CASP3/7 and 6 activities with age in the spleen (**Fig. 9D**).

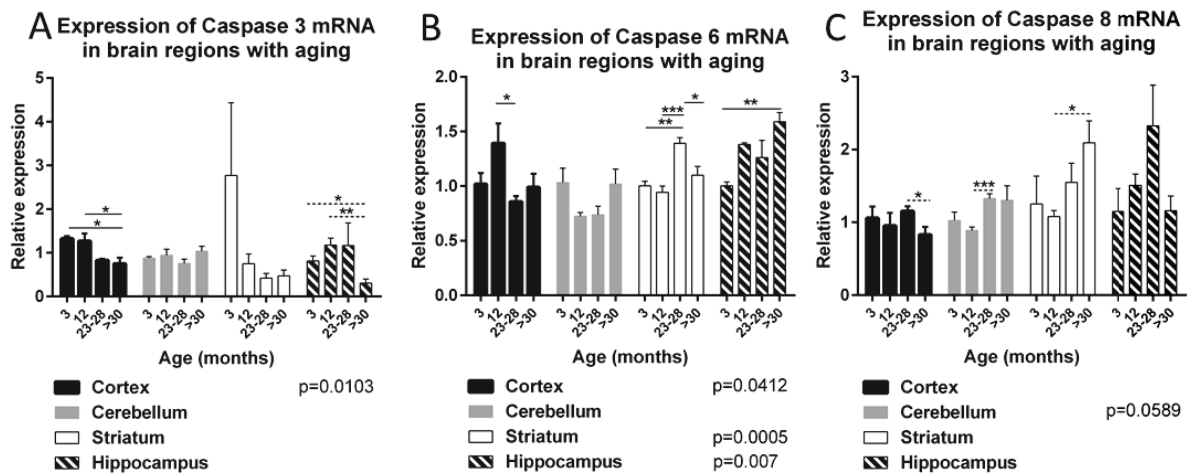




**Figure 9. Caspase 6 activity increases in the liver and kidney and Caspase 8 activity increase with aging in the kidney, heart and spleen. A)** A trend increase is observed in CASP3/7 activity in the liver (t test: 3 months vs. >30 months,  $p < 0.01$ ; 12 months vs. >30 months,  $p < 0.01$ ). No significant variation is observed in CASP6 and 8 activity **B)** In the kidney, CASP3/7 activity increase at 23-28 months of age (t test: 12 months vs. 23-28 months,  $p < 0.05$ ). Caspase 8 activity decrease at 12 months and increases at >30 months (ANOVA  $p = 0.03$ , *post hoc*: 3 months vs. 12 months,  $p < 0.05$ ; t test: 12 months vs. >30 months,  $p < 0.0001$ ). **C)** An increase is observed in the heart in CASP6 and 8 activity with aging (CASP6: t test: 23-28 months vs. >30 months,  $p < 0.05$ ; CASP8: t test: 3 months vs. 23-28 months,  $p < 0.05$ ; 3 months vs. >30 months,  $p < 0.05$ ). No significant variation is observed in CASP3/7 with aging in the heart. **D)** Caspase 8 activity increases with aging in the spleen (t test: 3 months vs. 23-28 months,  $p < 0.05$ ; 3 months vs. >30 months,  $p < 0.05$ ). No significant variation is observed in the spleen for CASP3/7 and 6 activity with aging.  $n = 4$  by age-group. Tukey's *post hoc* are presented on the graphs with lines and t test are presented using dotted lines.

### Variation of caspases expression and activities in brain regions with aging

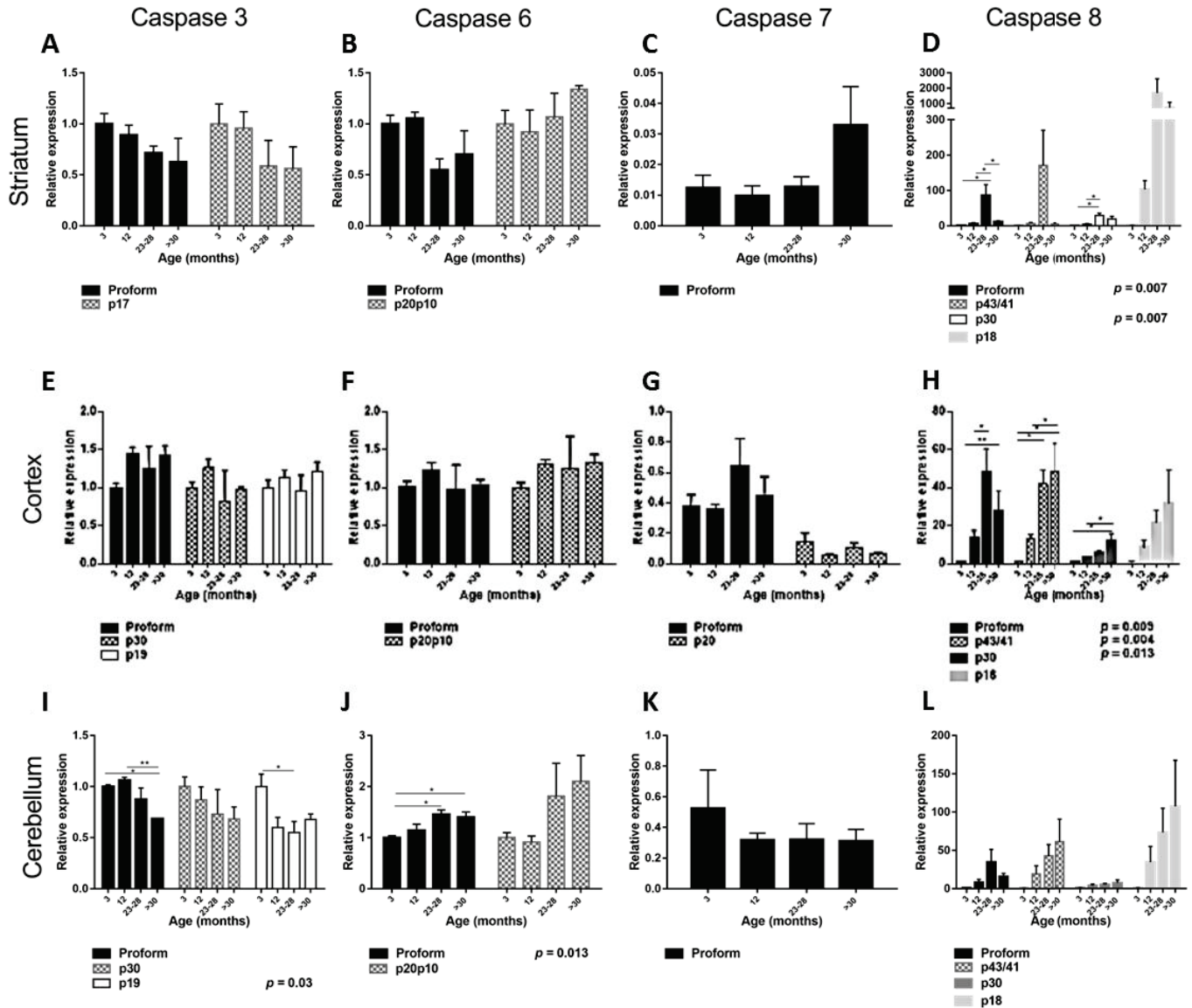
Decreased mRNA expression levels of all caspases analyzed is observed in the cortex with age. In the cerebellum, only a subtle increase in the mRNA expression of casp8 was observed at 23-28 months of age. Striatal mRNA expression levels of CASP6 and 8 increase with aging and hippocampal CASP6 mRNA expression levels increases while CASP3 mRNA decreases at an age of >30 months (**Fig. 10**).



**Figure 10. Caspase-6 mRNA expression increases in the striatum and hippocampus with age.** A) Caspase 3 mRNA expression decrease in the cortex and the hippocampus with age (Cortex: ANOVA  $p=0.0103$ , *post hoc*: 3 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ; 12 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ; Hippocampus: *t* test: 3 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ; 12 months vs. >30 months,  $p<0.01$ ). No significant variation is observed in CASP3 mRNA expression in the cerebellum and the striatum. B) In the cortex, caspase-6 mRNA expression decreases at 23-28 months of age (ANOVA  $p=0.04$ , *post hoc*: 12 months vs. 23-28 months,  $p<0.05$ ). In contrast, caspase-6 mRNA expression increases in the striatum and the hippocampus (Striatum: ANOVA  $p=0.0005$ , *post hoc*: 3 months vs. 23-28 months,  $p<0.01$ ; 12 months vs. 23-28 months,  $p<0.001$ ; 23-28 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ; Hippocampus: ANOVA  $p=0.007$ , *post hoc*: 3 months vs. >30 months,  $p<0.01$ ) No significant variation is observed in the cerebellum. C) Caspase 8 mRNA expression tends to decrease at >30 months of age in the cortex. In contrast, an increase in CASP8 mRNA expression is observed in the cerebellum and the striatum (Cerebellum: ANOVA  $p=0.0589$ , *t* test: 12 months vs. >30 months,  $p<0.001$ ; Striatum: *t* test: 12 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ).  $n=5$  by age-group. Tukey's *post hoc* are presented on the graphs with a continuous line and *t* test are presented on the graphs with a dotted line.



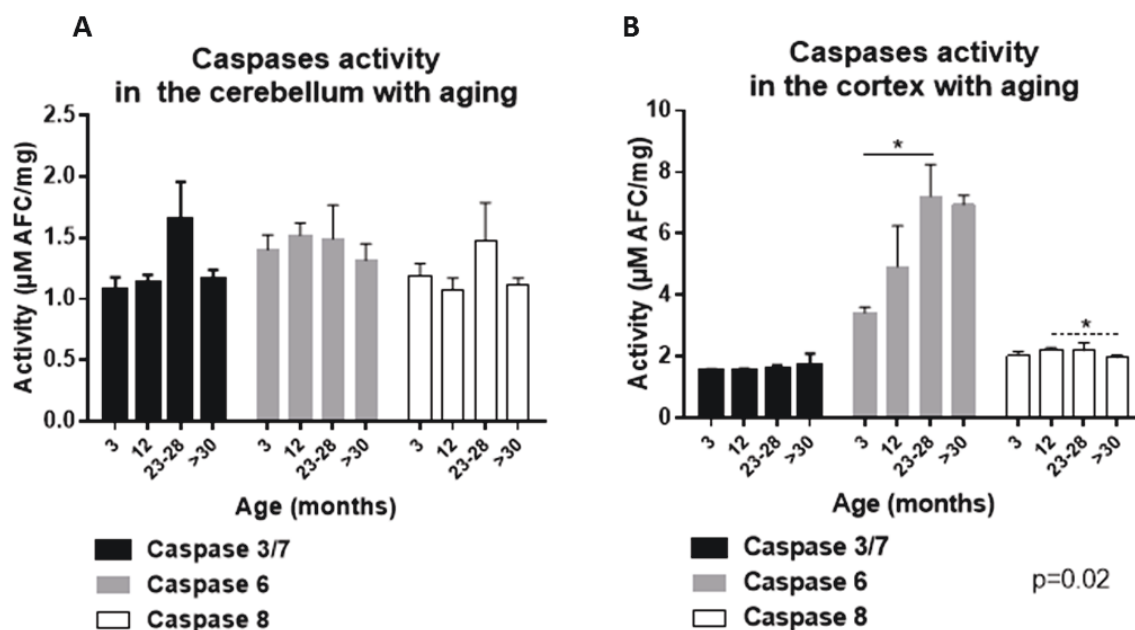




**Figure 11. Global increase in caspases protein expression level in the brain with the aging** A, B, C, D) Caspase-3 do not vary with age in the striatum whereas caspase-6 tends to decrease and caspase-7 and -8 increase with aging (B (proform) : t test: 3 months vs. 23-28 months; C (Proform):  $r^2=0.29$ ,  $p=0.04$ ; D (proform): ANOVA  $p=0.007$ ; D(p30) : ANOVA  $p=0.007$ ; D (p18) : t test: 3 months vs. 12 months,  $p<0.01$ ). E ,F ,H) Caspase-3, 6 and 8 expression increases or tends to increase with age in the cortex (E (proform): t test: 3 months vs. 12 months,  $p<0.5$ ; 3 months vs. >30 months,  $p<0.5$ ; F (p20p10): t test: 3 months vs. 12 months,  $p<0.5$ ; 3 months vs. >30 months,  $p<0.5$ ; H (proform): ANOVA  $p=0.009$ ; H (p43/41): ANOVA  $p=0.004$ ; H (p30) : ANOVA  $p=0.013$ ; H (p18) : t test 3 months vs. 23-28 months  $p<0.05$ ). G, K) No significant variation is observed in caspase-7 protein expression level in the cortex and cerebellum. I, J, L) Caspase-6 and 8 expression increases or tends to increase with age in the cerebellum whereas caspase-3 decreases with aging (I (proform): t test: 3 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ; 12 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ; I (30 kDa): ANOVA  $p=0.03$ ; J (proform): ANOVA  $p=0.013$ ; L (proform): t test: 3 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ; L (p43/41): t test: 3 months vs. >30 months,  $p<0.05$ ).  $n=4$  by age-group. Tukey's *post hoc* are presented on the graphs.

Striatal expression of the CASP6 zymogen decreases with age whereas the CASP6 cleaved

p20p10 form increases suggesting an increase in CASP6 prodomain cleavage upon the aging process (**Fig. 11A**). Furthermore, a strong increase in all protein forms of CASP8 is observed in the striatum at 23-28 months of age (Proform: 85-fold, p43/41: 170-fold, p30: 28-fold, p18: 1684-fold, **Fig. 11D**). A global increase of caspase protein expression is also detected in the cortex with the exception of CASP7 which does not vary with age in that brain region (**Fig. 11E-H**). A 28 to 48-fold increase is observed in cortical CASP8 protein expression, a 30-fold increase in CASP6 p20p10 and the CASP3 zymogen increases 43% with age (**Fig. 11D, 11E, 11H**). In the cerebellum, the CASP6 zymogen and cleaved p20p10 subunits also increase by 43% and 2-fold, respectively, with aging (**Fig. 11J**). Furthermore, a 15-fold and a 61-fold increase are noted with age in the CASP8 zymogen and the cleaved p43/41 fragments, respectively (**Fig. 11H**). Thus, similar to the other brain regions, the protein expression level of CASP6 and 8 increase with age in the cerebellum contrary to CASP3, which protein expression decreases in this tissue (**Fig. 11I, 11J, 11L**). Despite the increase in CASP6 and 8 mRNA and protein expression levels with aging in the cerebellum, no variation in cerebellar CASP3/7, 6 or 8 activity was observed in our samples (**Fig. 12A**). However, in the cortex, increasing CASP6 protein levels correlated with an increase in its activity at 23-28 months of age. Surprisingly, although the cortical protein expression of CASP8 increases, a decrease is observed in its activity (**Fig. 12B**).



**Figure 12. Caspase-6 activity increases in the cortex with aging.** A) No significant variation in caspases activity is observed with aging in the cerebellum. B) Caspase-6 increase while CASP8 activity tends to decrease in the cortex with aging (Caspase 6: ANOVA  $p=0.02$ , *post hoc* : 3 months vs. 23-28 months,  $p<0.05$  ; Caspase 8: t test: 12 months vs. >30 months ) No significant variation is observed in CASP3 activity.  $n=4$  by age-group. Tukey's *post hoc* are presented on the graphs with a continuous line and t test are presented on the graphs with dotted line.

## Discussion

We assessed cleavage of STK3 by CASP3, 6 and 7 and the expression levels of this substrate in several tissues during aging. We also assessed CASP3, 6, 7 and 8 expression and activity in peripheral organs and brain regions in the normal murine aging process (3 to 30 months of age). Overall, the pattern of mRNA and protein expression for CASP3, 6, 7 and 8, and their respective activities, vary strongly amongst the tissues tested and within the same organ, as observed in the different brain regions (**Table 1**). These results suggest a differential effect of aging on the apoptotic mechanisms and/or non-apoptotic functions of caspases. We demonstrate for the first time cleavage of STK3 by CASP7, which is often seen as redundant to CASP3, but which some studies show unique activities and substrate repertoire (Boucher *et al.*, 2012, Lamkanfi *et al.*, 2008, Slee *et al.*, 2001). Furthermore, we

show the protein expression of STK3 (FL and proteolytic fragments) globally increases throughout the organism upon the aging process.

	STK3				Caspase 3					Caspase 6				Caspase7				Caspase 8					
	RNA	FL	39 kDa	34 kDa	RNA	Pro	p30	p19/p17	*Activity	RNA	Pro	p20p10	Activity	Pro	p27	p20	*Activity	RNA	Pro	p43/41	p30	p18	Activity
Liver	↓	↓↑	↓	↑	-	-			↑	↓	↓		-	-	-		↑	↓	↑	↑		↑	-
Kidney	↓	-	↑	-	↑	↑		↓	↑	↓↑	↑	↑	-	↓	↓		↑	-	↑	↑		↑	↓↑
Heart	↓	-		-	↓	-			-	↓	-	↑	↑	↓			-	↓	↑	↑	↑	↑	↑
Spleen	↑	-	↑	↑	-	-			-	-	↓		-	-	↑	-	-	-	↑	↑	↑	↑	↑
Cortex	↑↑	↑		↑	↓	↑	-	-	-	↓	-	↑	↑	-		-	-	↓	↑	↑	↑	↑	↓
Cerebellum	↑	↑		↓↑	-	↓	↓	↓	-	-	↑	-	-	-			-	↑	↑	↑	-	-	-
Striatum	↑	-		-	-	-		-		↑↓	↓	-		↑				↑	↑↓		↑	↑	
Hippocampus	↑↓				↓					↑								-					

**Table 1. Summary table of the age associated variation in STK3 and caspases expression and activity.**

\*Analysis of CASP3 and CASP7 activity by the same peptide. Pro = Proform, FL = Full-length, p20p10 = CASP6 without the prodomain.

### Caspase-dependent processing of STK3

STK4, an STK3 homolog, is also a known death substrate of CASP3, 6 and 7 with cleavage resulting in the production of 36 and 40 kDa fragments and STK3 has been previously identified as a CASP3 and 6 substrate (O'Neill *et al.*, 2005, Riechers *et al.*, 2016a). In our study, we demonstrate the cleavage of STK3 by all three caspases. However, whereas all caspases generate a 34 kDa STK3 fragment, CASP6 also generates a 39 kDa fragment. The apoptotic functions of the STK4 36 kDa fragment are well described in the literature (Deng *et al.*, 2003b, Kilili & Kyriakis, 2010, Kim *et al.*, 2010, O'Neill *et al.*, 2004, Qin *et al.*, 2013) and some studies suggest that the 34 kDa STK3 fragment may have a similar role (Deng *et al.*, 2003b). However, to our knowledge, the existence and the production of the STK3 39 kDa fragment by a caspase has not been previously described. It is possible that these two fragments of STK3, as described earlier for two fragments of STK4, may not have the same function *in vivo*. Indeed, the 40 kDa fragment of STK4 produced by CASP7 cleavage has been identified to selectively phosphorylate JNK and p38 while the 36 kDa fragment of STK4, produced by CASP3 cleavage, has been identified to selectively

phosphorylate ERK (Song & Lee, 2008). Additional studies are required to provide more precision regarding the STK3 caspase cleavage sites and the functions of the STK3 fragments produced by these cleavages events.

### **STK3 expression level in peripheral organs**

In our studies, STK3 mRNA expression decreases in all peripheral organs except for the spleen where an increase is observed at 23-28 months of age. In contrast to the mRNA pattern, a global increase at the protein level in virtually all forms of STK3 is observed in these organs. Interestingly, the increase in fragment expression levels is not coupled with a decrease in the intact protein expression as may be expected due to cleavage. The increase in mRNA expression (and hence of the protein), in the spleen may compensate for the increased cleavage by caspases thereby stabilizing the FL form of STK3 in this organ. In the other peripheral organs, the stable or increasing level of the intact form may be a result of an increase in the half-life of the protein with age. For instance, the interaction of STK3 with phosphorylated RASSF2 which prevents STK3 degradation may be responsible for this stabilisation of the expression (Cooper *et al.*, 2009).

### **Caspases expression and processing of STK3 in the liver**

The decrease in CASP6 and 8 mRNA, and the decrease of caspase-3 and 6 protein expression in the liver with age corroborate the low cell death rate in this organ with aging observed in other studies (Suh, 2002a). The increase in the CASP8 active fragment may be more related to the non-apoptotic functions of the protease in the liver, such as cell proliferation and induction of inflammation (Ben Moshe *et al.*, 2007). Surprisingly, we did not detect a corresponding increase in CASP8 activity in the liver. The absence of any

significant variation in activity observed with aging in this organ may be a consequence of the presence of a natural inhibitor of casp8 such as c-flip or PI-9 in the protein lysates (LeBlanc, 2003). The increase observed in CASP3/7 activity at >30 months of age in the liver suggests that the increase in the 34 kDa fragment of STK3 observed may be due to CASP3 or CASP7 cleavage. It has been previously demonstrated that STK3 has predominantly anti-proliferative functions within hepatocytes (Jin *et al.*, 2009, Qin *et al.*, 2013). Therefore, the increase in STK3 cleavage in the liver may promote these anti-proliferative functions of STK3 in the aging process rather than cell death *per se*.

#### **Caspases expression and processing of STK3 in the kidney**

The trend increase in the 34 kDa fragment of STK3 present in the kidney may be a consequence of the increased activity of CASP3 observed in that organ. However, the increase in global expression of CASP6 in kidney suggests that it may also be responsible for the production of the 34 kDa fragment and suggests a role for this protease in the generation of the 39 kDa fragment, a fragment only produced by CASP6, and which is significantly increased with age in the kidney. However, no variation in activity is observed using the preferred CASP6 substrate. Therefore, it cannot be ruled out that a protease other than CASP6 cleaves STK3 to generate the 39 kDa STK3 fragments in the kidney. However, in addition to the presence of inhibitors (exogenous or endogenous) that can influence the result, the lack of specificity of the caspase peptidic substrates used in the activity assays that are available further requires caution in interpreting the results (McStay *et al.*, 2008). The increase in expression of STK3, and of all caspases tested (with exception of CASP7) in the kidney with aging, may reflect the increase in cell death observed

previously with aging by TUNEL in the glomerular and corticotubular areas in the kidney (Lim *et al.*, 2012a).

### **Caspases expression and processing of STK3 in the heart**

In the heart, a decrease in CASP3, 6 and 8 mRNA expression levels is observed with aging. Interestingly, these differences were only noted when compared to the >30 months age-group. It is important to note that there are many metabolic changes observed between long lived mice compared to their younger counterparts that could be responsible for these results (Bartke & Westbrook, 2012, Milman *et al.*, 2014, Sherlock & Toogood, 2007) as in general the normal life span of C57BL/6 mice is ~25 months. Moreover, these mice could be the result of a natural selection of a particular sub-group of individuals which may explain this decrease in caspases mRNA at >30 months of age. In contrast to the mRNA expression levels, CASP6 and 8 protein expression and activity increases with aging, which corroborates the previously observed ~30% loss of cardiomyocytes with age (Sheydina *et al.*, 2011a). The increase in CASP6 activity observed in the heart may be responsible for the increase in 34 kDa fragment of STK3 production observed in our results. However, the increase in the STK3 fragment is not coupled with a decrease in the FL protein expression. As a decrease in STK3 mRNA level is observed with aging, STK3 may be a target for post-translational modifications that promote an increase in the half-life of the protein or may interact with some proteins that slow down the degradation rate of STK3, such as RASSF2 (Cooper *et al.*, 2009).

### **Caspases expression and processing of STK3 in the spleen**

Decreases in caspase-6 protein expression, and an increase in CASP7 and 8 protein expression and CASP8 activity, were observed in the spleen with aging. Of note, *in vivo* CASP6 active fragments are very difficult to detect by Western blotting, possibly due to short protein half-life. The decrease in CASP6 proform levels may be due to the processing and activation of the caspase or a more efficient degradation as we did not detect a decrease in gene expression in the spleen. Similar to our results, an increase in the activity of CASP8 and cell death has previously been observed in old C57BL/6 mice spleenocytes (Itzhaki *et al.*, 2003). However, they also noted an increase in CASP3 activity between 2 and 15 months in old mice which we did not observe in our study. The difference between the ages selected (2 months of age considered in development in contrast to 3 months of age considered an adult), sex or strain of the mice used may be responsible for this difference. A trend increase is detected in all protein forms of STK3 in the spleen with aging. As no variation is observed in CASP3 expression or CASP3/7 activity, the increase in STK3 fragment may be attributable to CASP6 and/or CASP7 as we did detect subtle processing of the zymogens in the spleen.

### **Caspases expression and processing of STK3 in the brain**

Interestingly, the decrease in mRNA expression of STK3 and all caspases observed in the aging cortex does not reflect the variation at the protein level. All STK3 protein forms increase with age, which may be the result of a less efficient degradation of STK3, an increase of the protein half-life or, more generally, it may be the result of the decrease in proteasome activity previously observed in this brain region with aging (Baraibar & Friguet, 2012). An increase in CASP6 and a decrease in CASP8 activities were observed in the cortex with aging while no variation was detected in CASP3/7 activity. Thus, the strong



increase in cortical STK3 fragments may be the result of the cleavage of STK3 by CASP6. Interestingly, in contrast to peripheral tissue, no 39 kDa fragment is observed in any of the brain regions assessed which may suggest specific peripheral functions of this particular STK3 fragment.

At the mRNA level, there is no variation observed in aging in any of the genes analyzed in the cerebellum except for CASP8 mRNA that increases. This increase in CASP8 mRNA levels is coupled with a strong increase in CASP8 protein expression. The absence of mRNA variation in CASP3 and 6 is not translated to the protein levels. A decrease in CASP3 and an increase in CASP6 protein expression are observed with aging in the cerebellum which suggest that CASP8, and potentially CASP6, may be a key caspase in neurodegeneration in the cerebellum with aging. A previous study has observed that while there is a stable number of Purkinje cells in the cerebellum with aging, there are some sections of the cerebellum, such as the anterior lobe, in which a loss of these cells is observed with aging (Andersen *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2010). As our analysis consisted of the entire cerebellum samples, this region-specific effect might be lost. Surprisingly, the variations at the protein level, even the strong increase in all forms of CASP8 protein levels, are not reflected in the caspase activity assay results. Our data suggest that the increase in the 34 kDa STK3 fragments observed in the cerebellum may be due to CASP6 as both the proform and the fragments increase with age in this brain region. We observe that both the FL and the STK3 34kDa fragments increase in the cerebellum with age supporting a role for apoptosis and caspases in the cerebellum with aging.

The mRNA of CASP6 and 8 increase with age in the striatum. However, this variation is not reflected at the protein level for CASP6 which decreases with age. In contrast, all protein forms of CASP8 strongly increase with aging. Interestingly, between 23-28 months

and >30 months of age, the CASP8 proform decreases by 86%, which correlates with the high amount of fragment present. Therefore, the decrease observed in the CASP8 zymogen at >30 months of age may be due to the processing and activation of CASP8. As no variation in CASP3, and a decrease in CASP6 protein expressions is observed in the striatum, the increase observed in 34 kDa STK3 fragment protein in our data may be more attributable to its processing by CASP7, which has a trend increase in expression level with aging, to a less efficient degradation of the protein or an increase of the protein half-life. Of note, no small peptide substrate is available specifically for CASP3, or 7 (McStay *et al.*, 2008). Therefore, we cannot confirm this hypothesis using activity assays. This increase in STK3 fragment expression correlates with the age-associated increase in apoptosis observed previously in the striatum of Wistar 2BAW rats (Ureshino *et al.*, 2010). Of note, we did not have enough samples to assess caspase activity in the striatum.

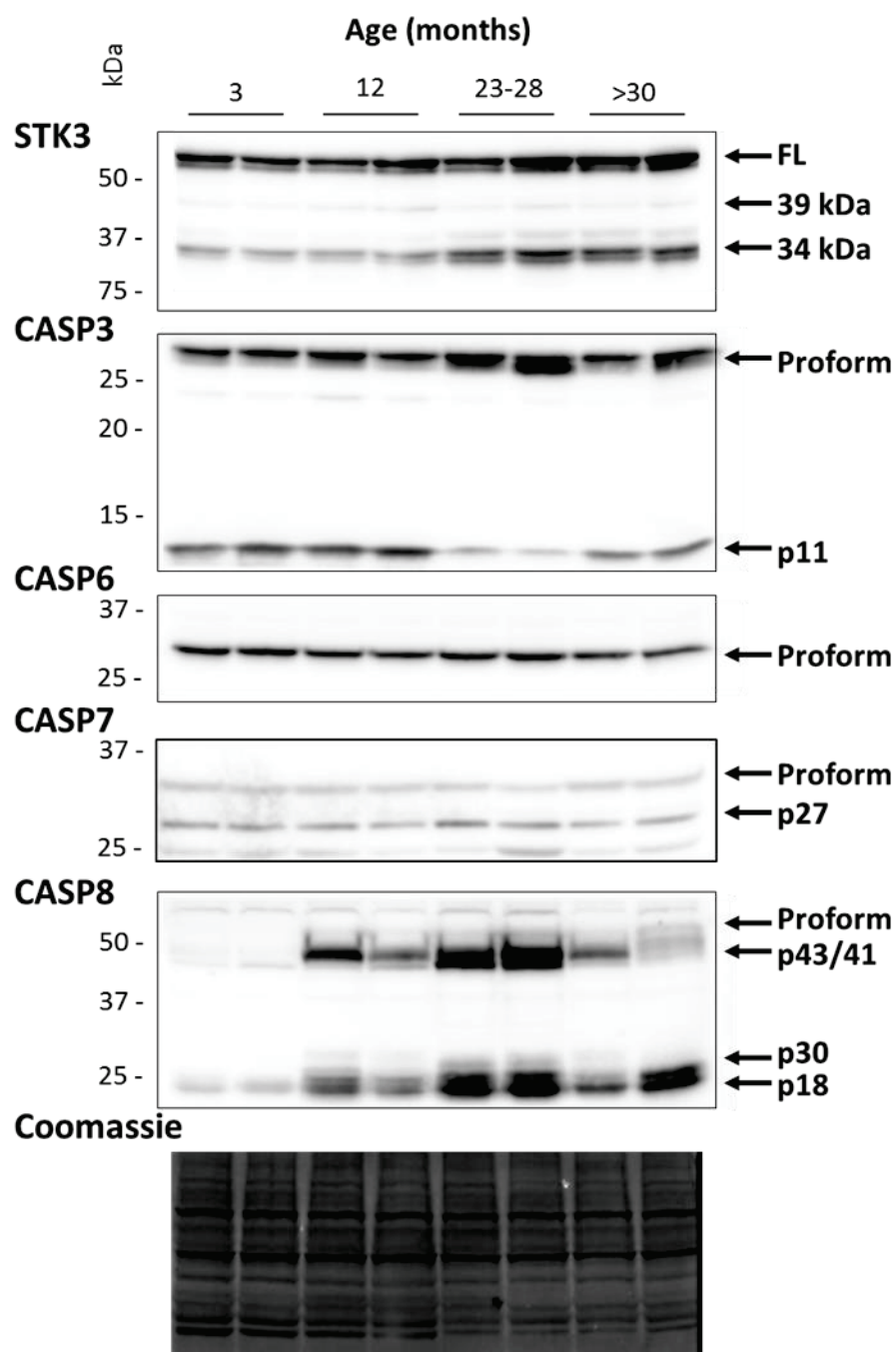
Finally, in the hippocampus, a decrease in CASP3 mRNA expression and an increase in the mRNA of CASP6 and STK3 are observed with aging. Of note, experiments in hippocampal primary cultures demonstrate that STK4, an homolog of STK3, is phosphorylated upon oxidative stress by c-abl leading to the stabilization of the protein expression of STK4 and the STK4-FOXO mediated cell death (Xiao *et al.*, 2011). Moreover, CASP6 is activated in neurodegenerative diseases and its activity in the hippocampal CA1 region is sufficient to induce neuronal degeneration, inflammation and age-related memory impairment (LeBlanc *et al.*, 2014, Ramcharitar *et al.*, 2013, Graham *et al.*, 2011b, Wang *et al.*, 2015). Thus, the increase in mRNA expression of STK3 and CASP6, a protease that cleaves STK3, highlight a possible role for STK3 in the neurodegeneration process in AD and potentially other neurodegenerative diseases. Unfortunately, we did not have enough hippocampal samples to assess protein expression of STK3 and caspases in this brain region.

## **Conclusion**

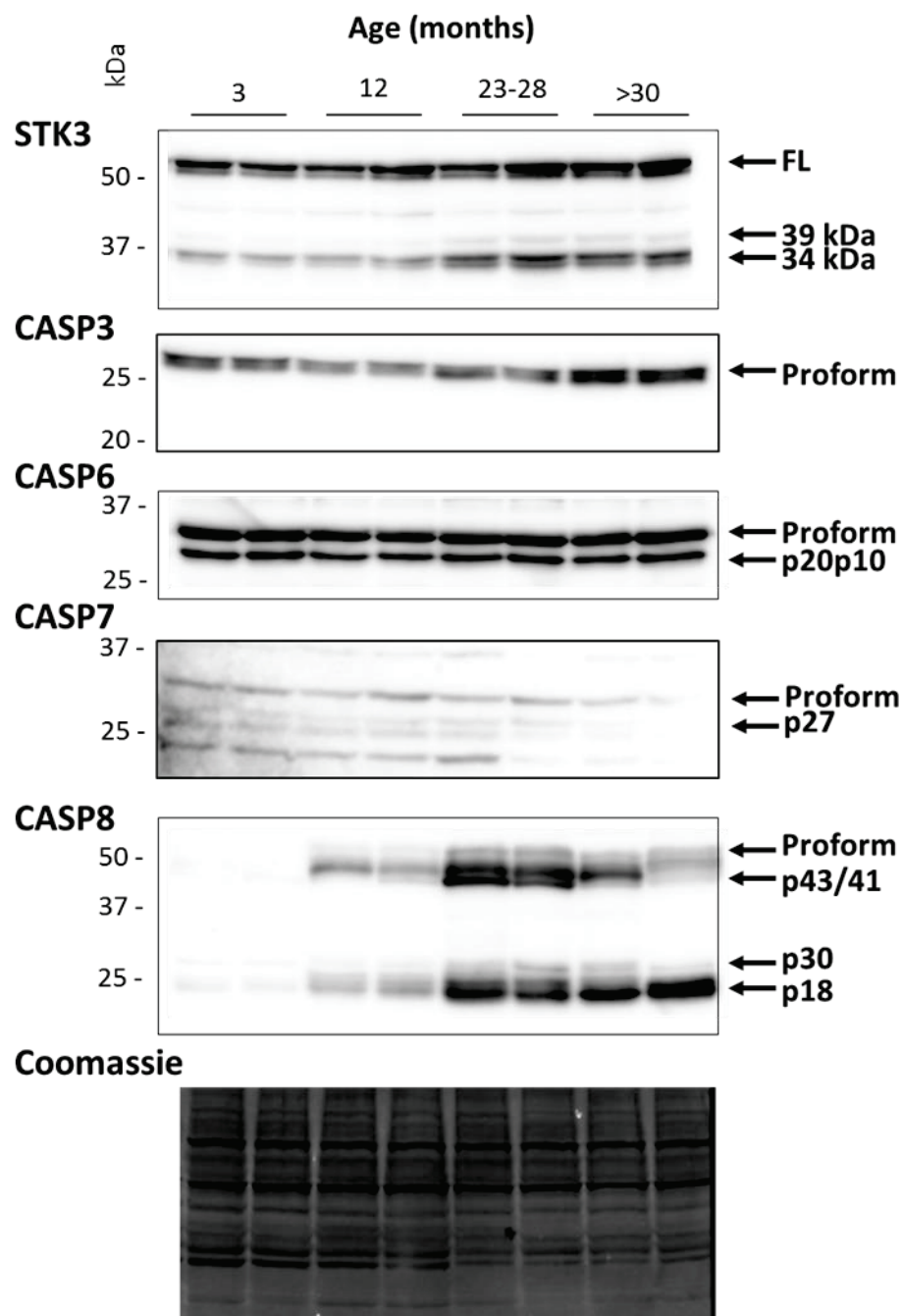
Overall, our results demonstrate that the pattern of mRNA and/or protein expression of CASP3, 6, 7 and 8 and their respective activity vary strongly throughout the organism and even amongst the same organ (as observed in the different brain regions) suggesting differential effects of aging on the apoptotic mechanism and/or non-apoptotic functions of caspases. Moreover, STK3 expression, a newly identified substrate of CASP6 and 7, globally increases throughout the organism with the aging process. To our knowledge, this is the first time that the caspase expression and activity have been investigated as extensively throughout the entire organism during the aging process. This study provides important details regarding the pattern of expression and activity of the caspases and the caspase substrate STK3 throughout the entire organism upon a physiological stress that is the normal aging process. These results further our understanding of the effect of aging on the organism without any pathological condition.

## **Acknowledgements**

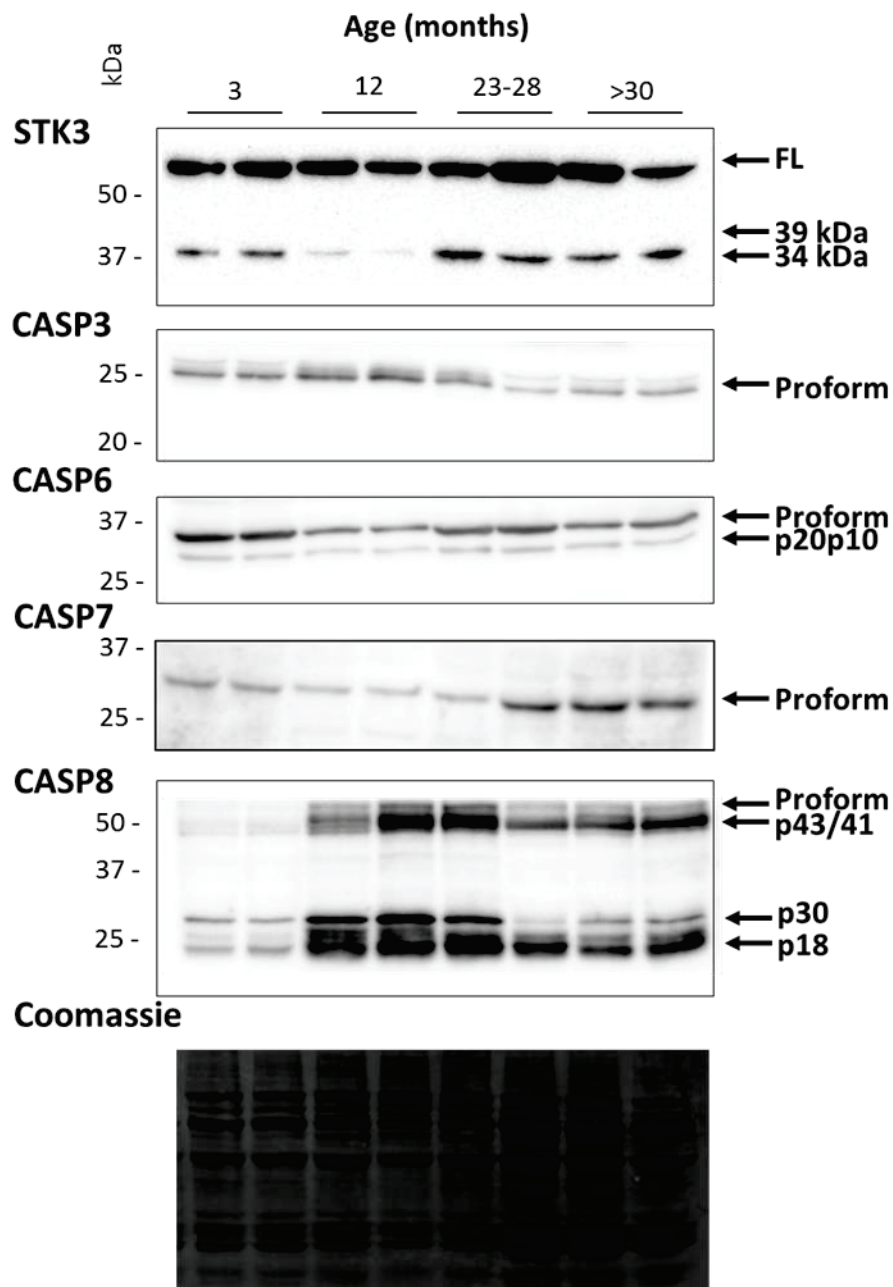
This research was undertaken, in part, by the Canada Research chairs program. RKG holds the Canada Research Chair in Neurodegenerative diseases. MLB held/holds scholarships from the Research Center on Aging, the Faculty of Medicine and Health Sciences of the University of Sherbrooke, the Canadian Institute for Health Research (CIHR) and Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS). JBD holds a grant from the Fonds de Recherche du Québec-Nature et Technologie (FRQ-NT) and an investigator award from the FRQS. GG holds a grant from the CIHR and an investigator award from the FRQS.



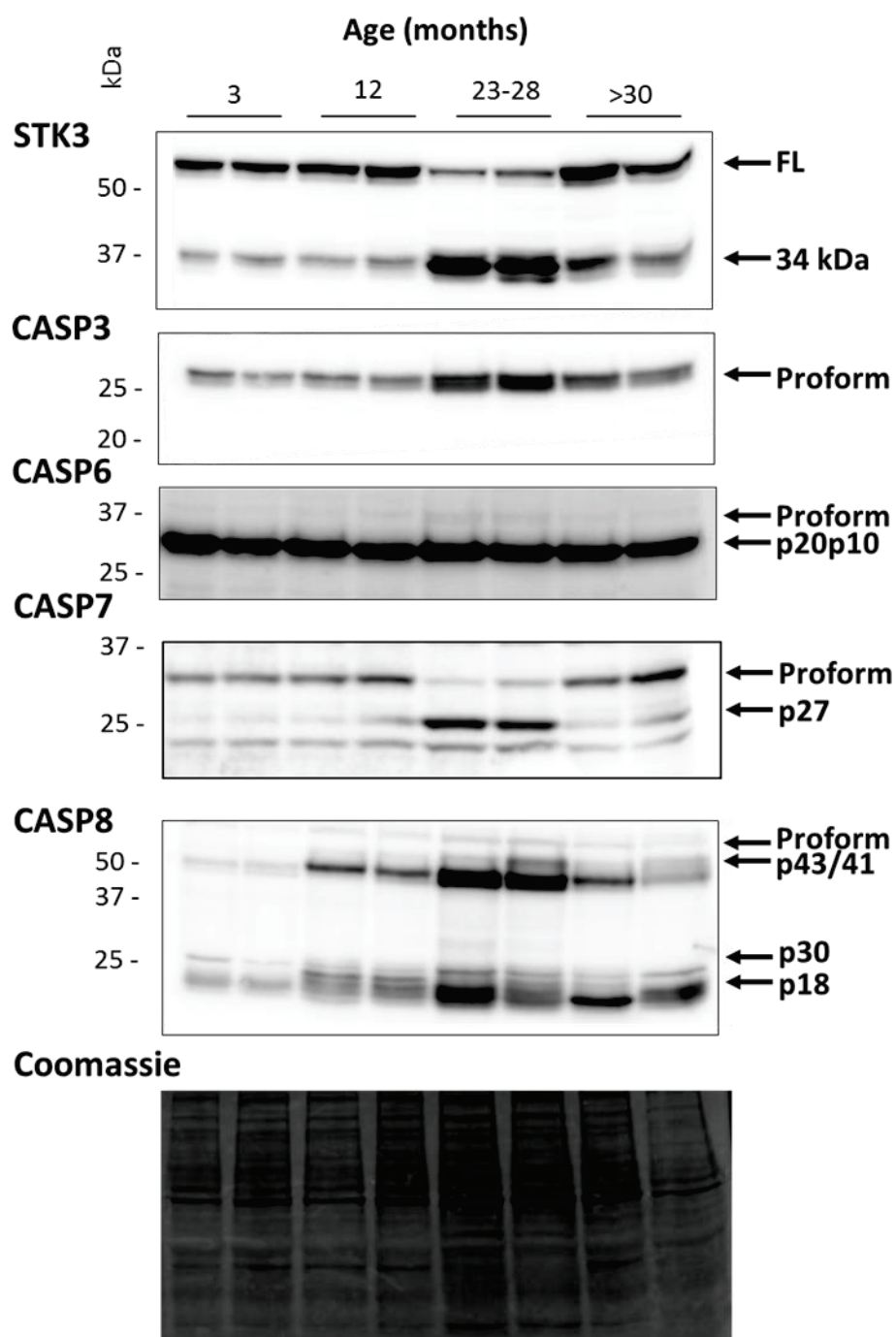
**Supplementary figure 1. Western blot of STK3, CASP3, CASP6, CASP7 and CASP8 in the liver. A)** An example of STK3, CASP3, CASP6, CASP7 and CASP8 immunoblot is presented of liver samples. The protein loading reference is the Coomassie blue staining for all the peripheral organs.



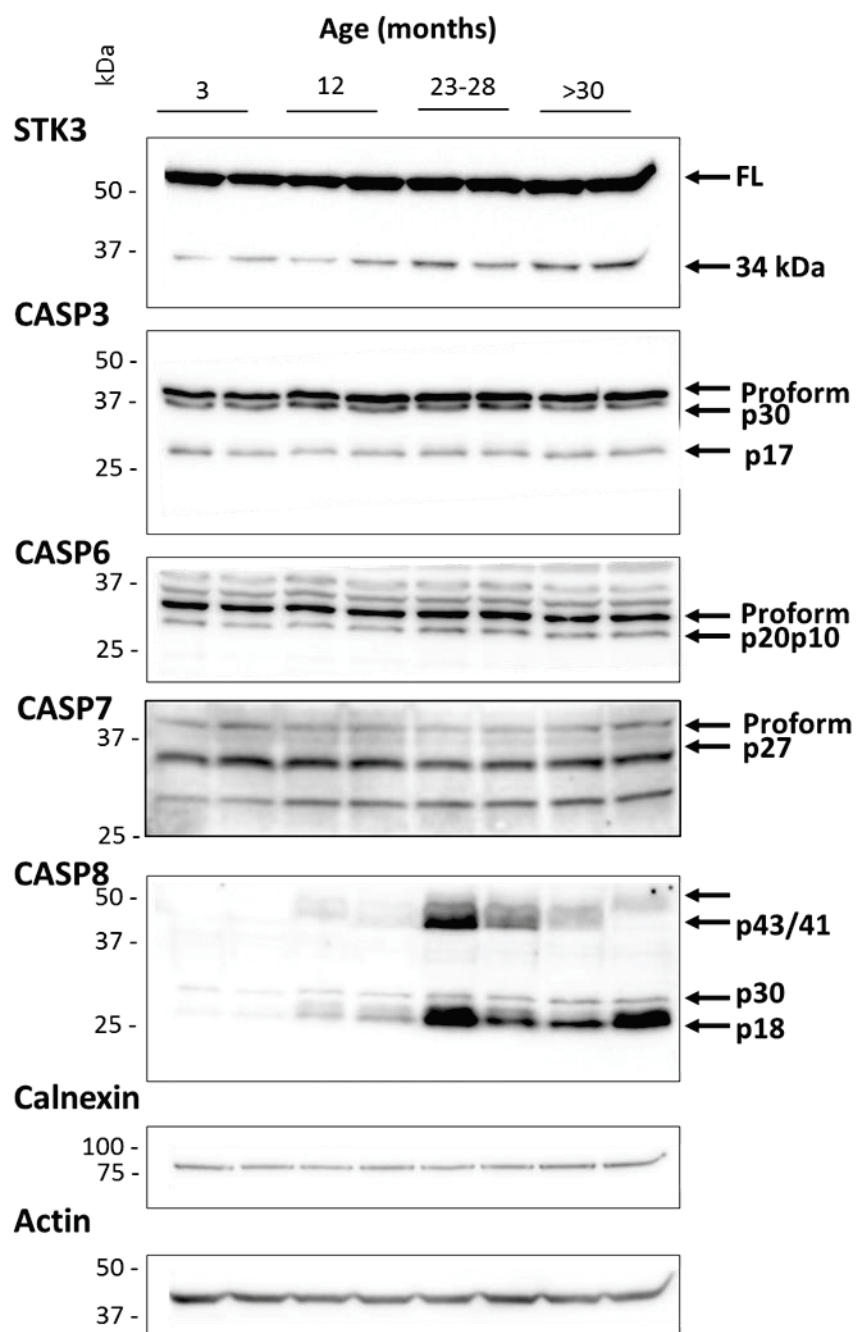
**Supplementary figure 2. Western blot of STK3, CASP3, CASP6 , CASP7 and CASP8 in the kidney A)** An example of STK3, CASP3, CASP6, CASP7 and CASP8 immunoblot is presented of kidney samples. The protein loading reference is the Coomassie blue staining for all the peripheral organs.



**Supplementary figure 3. Western blot of STK3, CASP3, CASP6 , CASP7 and CASP8 in the heart A)** An example of STK3, CASP3, CASP6, CASP7 and CASP8 immunoblot is presented of heart samples. The protein loading reference is the Coomassie blue staining for all the peripheral organs.

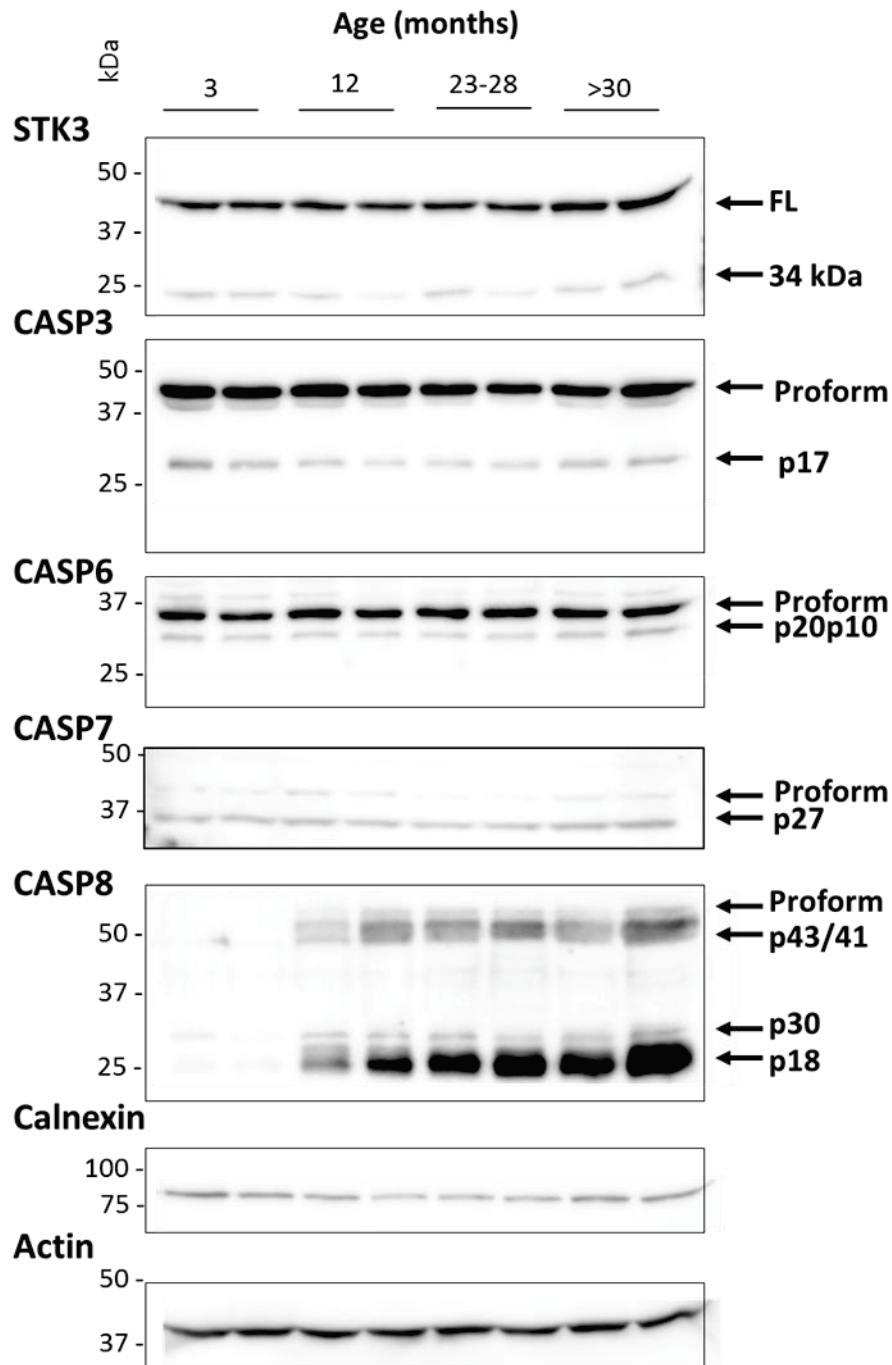


**Supplementary figure 4. Western blot of STK3, CASP3, CASP6 , CASP7 and CASP8 in the spleen A)** An example of STK3, CASP3, CASP6, CASP7 and CASP8 immunoblot is presented of spleen samples. The protein loading reference is the Coomassie blue staining for all the peripheral organs.

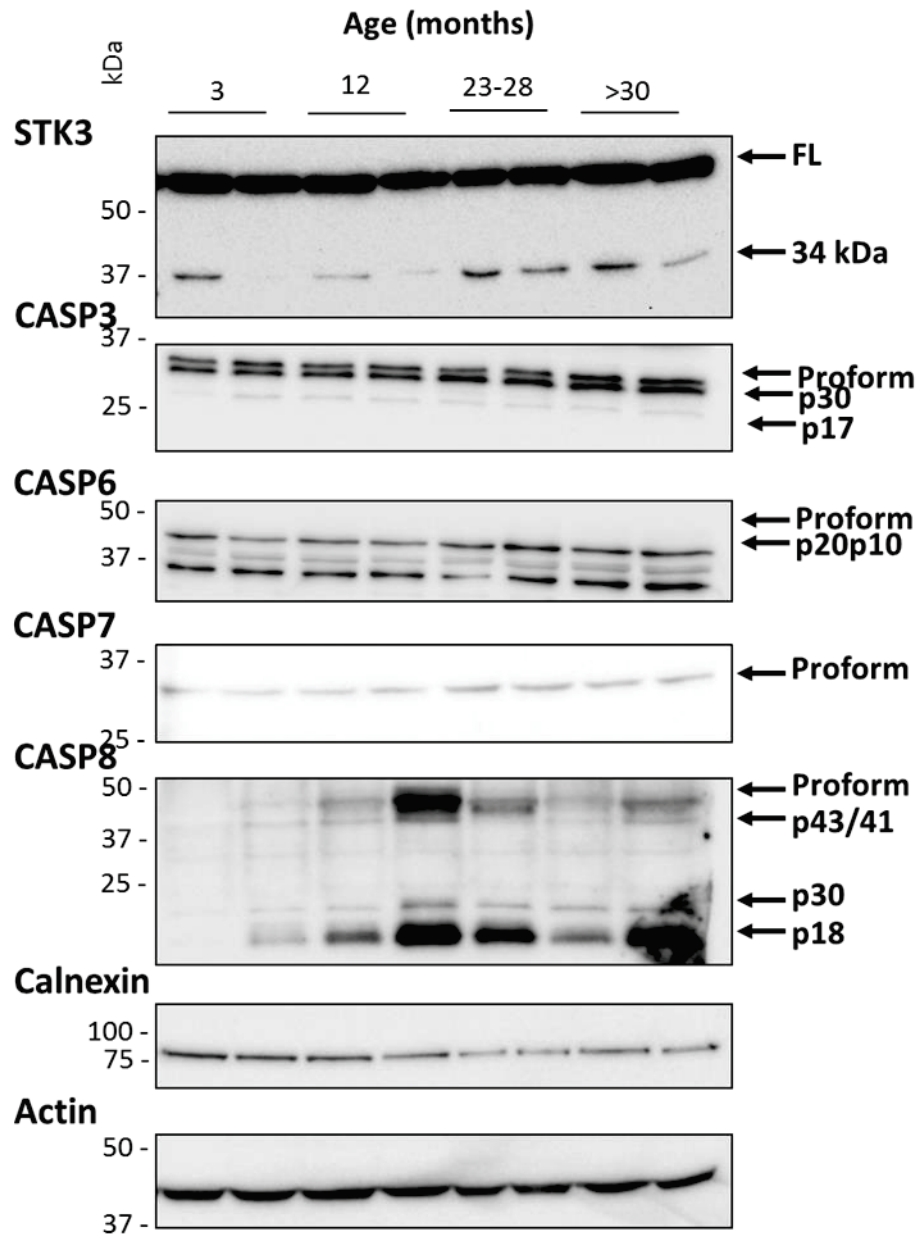


**Supplementary figure 5 Western blot of STK3, CASP3, CASP6, CASP7 and CASP8 in the cortex.** A) An example of STK3, CASP3, CASP6, CASP7 and CASP8 immunoblot is presented of cortex samples. The protein loading reference calnexin and actin were assessed in all brain regions.





**Supplementary figure 6. Western blot of STK3, CASP3, CASP6 , CASP7 and CASP8 in the cerebellum. A)** An example of STK3, CASP3, CASP6, CASP7 and CASP8 immunoblot is presented of cerebellum samples. The protein loading reference calnexin and actin were assessed in all brain regions.



**Supplementary figure 7. Western blot of STK3, CASP3, CASP6 , CASP7 and CASP8 in the striatum. A)** An example of STK3, CASP3, CASP6, CASP7 and CASP8 immunoblot is presented of striatum samples. The protein loading reference calnexin and actin were assessed in all brain regions.

## Reference

- Andersen, B. B., H. J. Gundersen, and B. Pakkenberg. 2003. 'Aging of the human cerebellum: a stereological study', *J Comp Neurol*, 466: 356-65.
- Baraibar, M. A., and B. Friguet. 2012. 'Changes of the proteasomal system during the aging process', *Prog Mol Biol Transl Sci*, 109: 249-75.
- Bartke, A., and R. Westbrook. 2012. 'Metabolic characteristics of long-lived mice', *Frontiers in genetics*, 3: 288.
- Ben Moshe, T., H. Barash, T. B. Kang, J. C. Kim, A. Kovalenko, E. Gross, M. Schuchmann, R. Abramovitch, E. Galun, and D. Wallach. 2007. 'Role of caspase-8 in hepatocyte response to infection and injury in mice', *Hepatology*, 45: 1014-24.
- Boucher, D., V. Blais, and J. B. Denault. 2012. 'Caspase-7 uses an exosite to promote poly(ADP ribose) polymerase 1 proteolysis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 5669-74.
- Boucher, D., C. Duclos, and J. B. Denault. 2014. 'General in vitro caspase assay procedures', *Methods Mol Biol*, 1133: 3-39.
- Broughton, B. R., D. C. Reutens, and C. G. Sobey. 2009. 'Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia', *Stroke*, 40: e331-9.
- Chung, L., and Y. C. Ng. 2006. 'Age-related alterations in expression of apoptosis regulatory proteins and heat shock proteins in rat skeletal muscle', *Biochim Biophys Acta*, 1762: 103-9.
- Cooper, W. N., L. B. Hesson, D. Matallanas, A. Dallol, A. von Kriegsheim, R. Ward, W. Kolch, and F. Latif. 2009. 'RASSF2 associates with and stabilizes the proapoptotic kinase MST2', *Oncogene*, 28: 2988-98.
- D'Amelio, M., V. Cavallucci, and F. Cecconi. 2010. 'Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death', *Cell Death Differ*, 17: 1104-14.
- Deng, Y., A. Pang, and J. H. Wang. 2003. 'Regulation of mammalian STE20-like kinase 2 (MST2) by protein phosphorylation/dephosphorylation and proteolysis', *The Journal of biological chemistry*, 278: 11760-67.
- Graham, R. K., D. E. Ehrnhoefer, and M. R. Hayden. 2011a. 'Caspase-6 and neurodegeneration', *Trends in neurosciences*, 34: 646-56.
- . 2011b. 'Caspase-6 and neurodegeneration', *Trends Neurosci*, 34: 646-56.
- Heallen, T., M. Zhang, J. Wang, M. Bonilla-Claudio, E. Klysik, R. L. Johnson, and J. F. Martin. 2011. 'Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size', *Science*, 332: 458-61.
- Itzhaki, O., E. Skutelsky, T. Kaptzan, J. Sinai, M. Michowitz, M. Huszar, and J. Leibovici. 2003. 'Ageing-apoptosis relation in murine spleen', *Mech Ageing Dev*, 124: 999-1012.
- Jin, J., G. L. Wang, L. Timchenko, and N. A. Timchenko. 2009. 'GSK3beta and aging liver', *Aging*, 1: 582-85.
- Kilili, G. K., and J. M. Kyriakis. 2010. 'Mammalian Ste20-like kinase (Mst2) indirectly supports Raf-1/ERK pathway activity via maintenance of protein phosphatase-2A catalytic subunit levels and consequent suppression of inhibitory Raf-1 phosphorylation', *J Biol Chem*, 285: 15076-87.
- Kim, D., S. Shu, M. D. Coppola, S. Kaneko, Z. Q. Yuan, and J. Q. Cheng. 2010. 'Regulation of proapoptotic mammalian ste20-like kinase MST2 by the IGF1-Akt pathway', *PLoS one*, 5: e9616.
- Kuranaga, E., and M. Miura. 2007. 'Nonapoptotic functions of caspases: caspases as regulatory molecules for immunity and cell-fate determination', *Trends Cell Biol*, 17: 135-44.

- Lamkanfi, M., T. D. Kanneganti, P. Van Damme, T. Vanden Berghe, I. Vanoverberghe, J. Vandekerckhove, P. Vandenabeele, K. Gevaert, and G. Nunez. 2008. 'Targeted peptidecentric proteomics reveals caspase-7 as a substrate of the caspase-1 inflammasomes', *Mol Cell Proteomics*, 7: 2350-63.
- LeBlanc, A. C. 2003. 'Natural cellular inhibitors of caspases', *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 27: 215-29.
- . 2013. 'Caspase-6 as a novel early target in the treatment of Alzheimer's disease', *Eur J Neurosci*, 37: 2005-18.
- LeBlanc, A. C., J. Ramcharitar, V. Afonso, E. Hamel, D. A. Bennett, P. Pakavathkumar, and S. Albrecht. 2014. 'Caspase-6 activity in the CA1 region of the hippocampus induces age-dependent memory impairment', *Cell Death Differ*, 21: 696-706.
- Lee, K. K., M. Murakawa, E. Nishida, S. Tsubuki, S. Kawashima, K. Sakamaki, and S. Yonehara. 1998. 'Proteolytic activation of MST/Krs, STE20-related protein kinase, by caspase during apoptosis', *Oncogene*, 16: 3029-37.
- Lee, K. K., T. Ohyama, N. Yajima, S. Tsubuki, and S. Yonehara. 2001. 'MST, a physiological caspase substrate, highly sensitizes apoptosis both upstream and downstream of caspase activation', *The Journal of biological chemistry*, 276: 19276-85.
- Lee, S. T., and M. Kim. 2006. 'Aging and neurodegeneration. Molecular mechanisms of neuronal loss in Huntington's disease', *Mech Ageing Dev*, 127: 432-5.
- Lessard-Beaudoin, M., M. Laroche, M. J. Demers, G. Grenier, and R. K. Graham. 2015. 'Characterization of age-associated changes in peripheral organ and brain region weights in C57BL/6 mice', *Exp Gerontol*, 63: 27-34.
- Li, P., Y. Chen, K. K. Mak, C. K. Wong, C. C. Wang, and P. Yuan. 2013. 'Functional role of Mst1/Mst2 in embryonic stem cell differentiation', *PLoS one*, 8: e79867.
- Lim, J. H., E. N. Kim, M. Y. Kim, S. Chung, S. J. Shin, H. W. Kim, C. W. Yang, Y. S. Kim, Y. S. Chang, C. W. Park, and B. S. Choi. 2012. 'Age-associated molecular changes in the kidney in aged mice', *Oxid Med Cell Longev*, 2012: 171383.
- Liu, A. M., K. F. Wong, X. Jiang, Y. Qiao, and J. M. Luk. 2012. 'Regulators of mammalian Hippo pathway in cancer', *Biochim Biophys Acta*, 1826: 357-64.
- Liu, W., J. Wu, L. Xiao, Y. Bai, A. Qu, Z. Zheng, and Z. Yuan. 2012. 'Regulation of neuronal cell death by c-Abl-Hippo/MST2 signaling pathway', *PLoS one*, 7: e36562.
- McStay, G. P., G. S. Salvesen, and D. R. Green. 2008. 'Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways', *Cell Death Differ*, 15: 322-31.
- Mersamer, P. I., Y. Liu, W. He, M. D. Hirschey, D. Chen, and E. Verdin. 2013. 'The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link', *Aging (Albany NY)*, 5: 144-50.
- Milman, S., G. Atzmon, D. M. Huffman, J. Wan, J. P. Crandall, P. Cohen, and N. Barzilai. 2014. 'Low insulin-like growth factor-1 level predicts survival in humans with exceptional longevity', *Aging cell*, 13: 769-71.
- O'Neill, E. E., D. Matallanas, and W. Kolch. 2005. 'Mammalian sterile 20-like kinases in tumor suppression: an emerging pathway', *Cancer research*, 65: 5485-87.
- O'Neill, E., L. Rushworth, M. Baccarini, and W. Kolch. 2004. 'Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1', *Science*, 306: 2267-70.
- Oh, S., D. Lee, T. Kim, T. S. Kim, H. J. Oh, C. Y. Hwang, Y. Y. Kong, K. S. Kwon, and D. S. Lim. 2009. 'Crucial role for Mst1 and Mst2 kinases in early embryonic development of the mouse', *Mol Cell Biol*, 29: 6309-20.
- Patten, D. A., M. Germain, M. A. Kelly, and R. S. Slack. 2010. 'Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration', *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 2: S357-67.

- Pattison, L. R., M. R. Kotter, D. Fraga, and R. M. Bonelli. 2006. 'Apoptotic cascades as possible targets for inhibiting cell death in Huntington's disease', *J Neurol*, 253: 1137-42.
- Qin, F., J. Tian, D. Zhou, and L. Chen. 2013. 'Mst1 and Mst2 kinases: regulations and diseases', *Cell Biosci*, 3: 31.
- Ramcharitar, J., V. M. Afonso, S. Albrecht, D. A. Bennett, and A. C. LeBlanc. 2013. 'Caspase-6 activity predicts lower episodic memory ability in aged individuals', *Neurobiol Aging*, 34: 1815-24.
- Riechers, SP., S. Butland, Y. Deng, N. Skotte, D. E. Ehrnhoefer, J. Russ, J. Laine, M. Laroche, M. A. Pouladi, E. Wanker, M. R. Hayden, and R. K. Graham. 2016. 'Interactome network analysis identifies multiple caspase-6 interactors involved in the pathogenesis of HD', *Human molecular genetics*.
- Schwerk, C., and K. Schulze-Osthoff. 2003. 'Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation', *Biochem Pharmacol*, 66: 1453-8.
- Sherlock, M., and A. A. Toogood. 2007. 'Aging and the growth hormone/insulin like growth factor-I axis', *Pituitary*, 10: 189-203.
- Sheydina, A., D. R. Riordon, and K. R. Boheler. 2011. 'Molecular mechanisms of cardiomyocyte aging', *Clin Sci (Lond)*, 121: 315-29.
- Shimohama, S., H. Tanino, and S. Fujimoto. 2001. 'Differential expression of rat brain caspase family proteins during development and aging', *Biochem Biophys Res Commun*, 289: 1063-6.
- Slee, E. A., C. Adrain, and S. J. Martin. 2001. 'Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis', *J Biol Chem*, 276: 7320-6.
- Snigdha, S., E. D. Smith, G. A. Prieto, and C. W. Cotman. 2012. 'Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death', *Neurosci Bull*, 28: 14-24.
- Song, J. J., and Y. J. Lee. 2008. 'Differential cleavage of Mst1 by caspase-7/-3 is responsible for TRAIL-induced activation of the MAPK superfamily', *Cell Signal*, 20: 892-906.
- Suh, Y. 2002. 'Cell signaling in aging and apoptosis', *Mech Ageing Dev*, 123: 881-90.
- Ureshino, R. P., C. R. Bertoncini, M. J. Fernandes, F. M. Abdalla, C. S. Porto, Y. T. Hsu, G. S. Lopes, and S. S. Smaili. 2010. 'Alterations in calcium signaling and a decrease in Bcl-2 expression: possible correlation with apoptosis in aged striatum', *J Neurosci Res*, 88: 438-47.
- Wang, X. J., Q. Cao, Y. Zhang, and X. D. Su. 2015. 'Activation and regulation of caspase-6 and its role in neurodegenerative diseases', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 55: 553-72.
- Xiao, L., D. Chen, P. Hu, J. Wu, W. Liu, Y. Zhao, M. Cao, Y. Fang, W. Bi, Z. Zheng, J. Ren, G. Ji, Y. Wang, and Z. Yuan. 2011. 'The c-Abl-MST1 signaling pathway mediates oxidative stress-induced neuronal cell death', *J Neurosci*, 31: 9611-9.
- Zhang, C., Q. Zhu, and T. Hua. 2010. 'Aging of cerebellar Purkinje cells', *Cell Tissue Res*, 341: 341-7.
- Zhang, J. H., Y. Zhang, and B. Herman. 2003. 'Caspases, apoptosis and aging', *Ageing Res Rev*, 2: 357-66.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Modèle animale

#### *Étude sur le vieillissement*

Des souris C57BL/6NCrl mâle de type sauvage ont été élevées à l'animalerie de l'Université de Sherbrooke. Les 4 groupes d'âge ont été sélectionnés afin de représenter tout le processus du vieillissement partant de jeunes adultes (3-4 mois) à de vieilles souris (>30 mois, équivalent à un centenaire). Après le sevrage, à l'âge de 21 jours, les animaux ont été maintenus dans des cages individuelles et ont été soumis à un cycle normal de lumière et d'obscurité. La nourriture utilisée provient de Charles River (#5075-U.S., Agribrands Canada). Le comité d'éthique de l'Université de Sherbrooke a approuvé le protocole pour cette étude (protocole 303-12 et 133-14B). Les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane (Abbott) et euthanasiées par dislocation cervicale. La partie supérieure du crâne est retirée et le cerveau y est extrait. Le cerveau est ensuite disséqué et les régions cérébrales suivantes sont retirées séquentiellement : cortex, striatum, hippocampe et cervelet. Les organes périphériques suivants ont été récoltés : foie, rein, rate et cœur. Tous les organes ont été inspectés visuellement pour la présence de pathologies grossières.

#### *Étude sur la maladie de Huntington*

Des souris FVB de type sauvage et YAC128 ont été élevées à l'animalerie de l'Université de Colombie-Britannique. Le comité d'éthique de l'Université de Colombie-Britannique (A12-0063) et de l'Université de Sherbrooke (374-14 et 375-14) ont approuvé les protocoles expérimentaux. Des souris de type sauvage et YAC128 de 3 mois (présymptomatiques) et 12 mois (post-symptomatiques), mâles et femelles ont été anesthésiées et euthanasiées de la même façon que les souris C57BL/6NCrl pour l'étude sur le vieillissement. Les régions cérébrales ont été récoltées telles que décrites précédemment.

### Analyse de l'expression

#### *Expression protéique et immunobuvardage de type Western*

Les échantillons tissulaires ou cellulaires ont été homogénéisés et soniqués dans un tampon de lyse sucrose (0.32 mM Sucrose, 20 mM Tris pH 7.2, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA pH

7.2) ou NP-40 (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40) respectivement, contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche), 4.2 mM de PefaBloc SC (Roche) et 10  $\mu$ M d'inhibiteur de caspases, Z-VAD-fmk (Enzo Life Sciences). Le lysat est ensuite clarifié par centrifugation à 13, 000 rpm à 4°C et la concentration protéique du surnageant est dosé à l'aide de la méthode de l'acide bicinchonique ou BCA (Pierce). Le lysat protéique (50  $\mu$ g) est séparé sur un gel dénaturant de type SDS-PAGE 7.5 ou 10% et transféré sur une membrane de PVDF (PerkinElmer). Des immunobuvardages de type western sont réalisés sur la membrane utilisant les anticorps suivants : anti-STK3 (ab52641, Abcam, 1:1000), anti-DAXX (ab105173, Abcam, 1:1000), caspase -3 (9662, Cell signaling, 1:1000), caspase-6 (9762, Cell signaling, 1:500), caspase-8 (9746, Cell signaling, 1:500), anti-actin (MAB1501, Millipore, 1:10000) ou anti-calnexine (ab75801, Abcam, 1:2000). Les valeurs densitométriques découlant de l'activité peroxydase ont été obtenues avec le système d'imagerie Odyssey Fc (Mandel) en utilisant le substrat Luminata Crescendo Western HRP (Millipore). La quantification de la  $\beta$ -actine, de la calnexine ou d'une coloration au coomassie effectué sur la membrane ont été utilisée afin de standardiser la quantité de protéine présente dans chaque puits.

#### ***Réaction en chaîne par polymérase en temps réel (RT-PCR)***

L'ARN total a été extrait des échantillons tissulaires ou cellulaires avec le RNeasy mini kit (QIAGEN) et des cDNAs ont ensuite été préparé utilisant la transcriptase inverse ProtoScript II (New England BioLabs). La quantification de l'ARNm a été réalisée en utilisant le système de QPCR Mx3005P (Stratagene) avec les amorces présenté dans le tableau suivant. L'amplification de la  $\beta$ -actine a été utilisé pour standardisé la quantité d'ARN dans la réaction. Les niveaux d'expression génique ont été mesurés à l'aide du logiciel MxPro QPCR (Stratagene)

Gène	Spécificité	Sens	Anti-sens
<b>Caspase-3</b>	Souris	5'-TGTCATCTCGCTCTGGTACG-3'	5'-TCCCATAAATGACCCCTTCA-3'
<b>Caspase-6</b>	Souris	5'-TGGCTCCTGGTACATTCAGGAT-3'	5'-TCCGTGAACTCCAGGGAAGT-3'
<b>Caspase-8</b>	Souris	5'-CCTAGACTGCAACCGAGAGG-3'	5'-GCAGGCTCAAGTCATCTTCC-3'
<b>β-actin</b>	Souris	5'-ACGGCCAGGTCATCACTATTG-3'	5'-CAAGAAGGAAGGCTGGAAAAGA-3'
<b>STK3</b>	Souris	5'-AGGCCCTATGTCCAACAGTG-3'	5'-CCATCATGGGGTCTAGTGCT-3'
<b>DAXX</b>	Souris	5'-CTCTCCAGGGTCTGTCTCG-3'	5'-GGGATCTGTGGGAGGGTTAT-3'

**Table 1. Séquences des amorces utilisées pour ce projet.**

### Essai de clivage

Des échantillons de cerveau ont été homogénéisés et soniqués tels que décrits précédemment en omettant l'ajout d'inhibiteur de caspases. Des caspases recombinantes ont été exprimées purifiées et caractérisées telles que décrites dans l'article de Boucher et collaborateur (Boucher *et al.*, 2014). Les caspases (3,6 et 7) ont été diluées dans un tampon de réaction (100 mM Hepes pH 7.4, 200 mM NaCl, 0.2% CHAPS, 2 mM EDTA, 20% glycérol) à une concentration de 2000 nM et sont diluées en série. Les concentrations finales utilisées dans chaque réaction sont de 0, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, et 1000 nM pour chaque caspase. Les caspases recombinantes diluées et 50 µg de lysat de cerveau sont préchauffés séparément à 37 °C pour 30 min, puis mélangés et incubés pour 90 min à 37 °C. L'immunobuvardage a ensuite été effectué tel que décrit précédemment.

### Essai d'activité de caspases

Des échantillons de cerveau ont été homogénéisés et soniqués tels que décrits précédemment en omettant l'ajout d'inhibiteur de caspases. L'activité endogène de CASP3, 6 et 8 a été mesurée dans les lysats en utilisant leurs substrats fluorogéniques préférés AcDEVD-AFC, AcVEID-AFC et AcIETD-AFC, respectivement (Enzo Life sciences) à 37°C pour 60 min. Il est aussi à noter que AcDEVD-Afc est aussi le substrat préféré de CASP7 et que les substrats peptidiques sont rarement spécifiques qu'à une seule caspase (McStay *et al.*, 2008). La fluorescence générée a été mesurée à l'aide du lecteur de plaque VICTOR X Multilabel spectrophotomètre (PerkinElmer).



## **Culture cellulaire**

### ***Modèles cellulaires***

Les lignées cellulaires modèles de la maladie de Huntington STHdh<sup>Q7</sup> et STHdh<sup>Q111</sup> ont été obtenues via l'institut « Coriell for medical research » (CH00097 et CH00095 respectivement). Ces lignées neuronales striatales sont dérivées de souris transgénique knock-in homozygote exprimant gène Huntingtin contenant l'exon 1 humanisé avec 7 ou 111 répétitions CAG. Les cellules sont cultivées dans un milieu élevé en glucose (DMEM), 10% FBS, 40 mg/ml de G418, pénicilline /streptomycine et Glutamax.

### ***Induction de stress cellulaires***

#### *Déprivation de sérum*

Lorsque les cellules ont atteint ~ 60% de confluence, le milieu est changé pour du milieu sans sérum pour une durée de 0 min, 30 min, 1h, 3h, 6h, 12h ou 24h. Les cellules sont alors récoltées dans du PBS stérile pour les analyses de l'expression protéique et d'ARNm. Du milieu provenant de chacun des pétris est récolté pour l'analyse de la cytotoxicité.

#### *Stimulation au NMDA*

Lorsque les cellules ont atteint ~ 60% de confluence, le milieu est changé pour du milieu contenant 50  $\mu$ M de NMDA. Les pétris sont incubés 1h à 37°C puis le milieu est changé pour du milieu conditionné pour une durée de 0 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 8h ou 24h. Les cellules sont alors récoltées dans du PBS stérile pour les analyses de l'expression protéique et d'ARNm. Du milieu provenant de chacun des pétris est récolté pour l'analyse de la cytotoxicité.

#### *Essai lactate déshydrogénase*

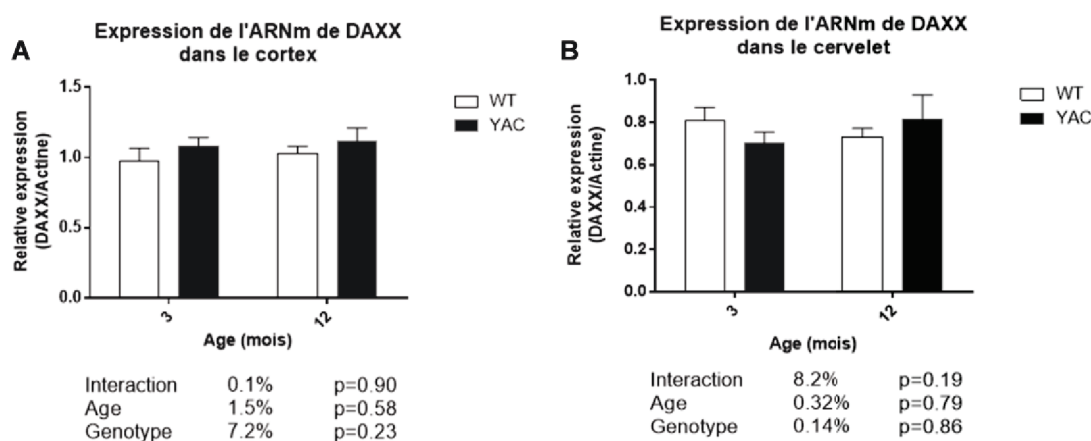
Les échantillons de milieu récoltés précédemment sont clarifiés par centrifugation pour enlever toutes cellules ou débris présents dans le milieu. 100  $\mu$ l de dilutions appropriés du surnageant sont déposés dans une plaque 96 puits, mélangés à 100  $\mu$ l de tampon de réaction (Cytotoxicity detection kit, Roche) puis incubés à température pièce pour une période de 30 min à l'abri de la lumière. La mesure de l'absorbance à 490 et 680 nm (référence) a été réalisée à l'aide du lecteur de plaque VICTOR X Multilabel spectrophotomètre (PerkinElmer).

## RÉSULTATS

### Maladie de Huntington

#### *Dérèglement de l'expression et du clivage de DAXX dans la maladie de Huntington*

Afin de vérifier si l'expression génique de DAXX est altérée dans la maladie de Huntington, nous avons analysé les niveaux d'ARNm de DAXX par RT-PCR dans le cortex et le cervelet d'un modèle murin de la maladie, les souris YAC128, comparées aux souris de type sauvage. Ces deux régions cérébrales ont été choisies pour leur implication dans la cognition et dans la motricité. Le striatum, région importante pour la coordination fine des mouvements, sera évalué ultérieurement dans l'étude. Deux groupes d'âge ont été sélectionnés, soit 3 mois et 12 mois, afin de déterminer si l'altération est observée avant ou



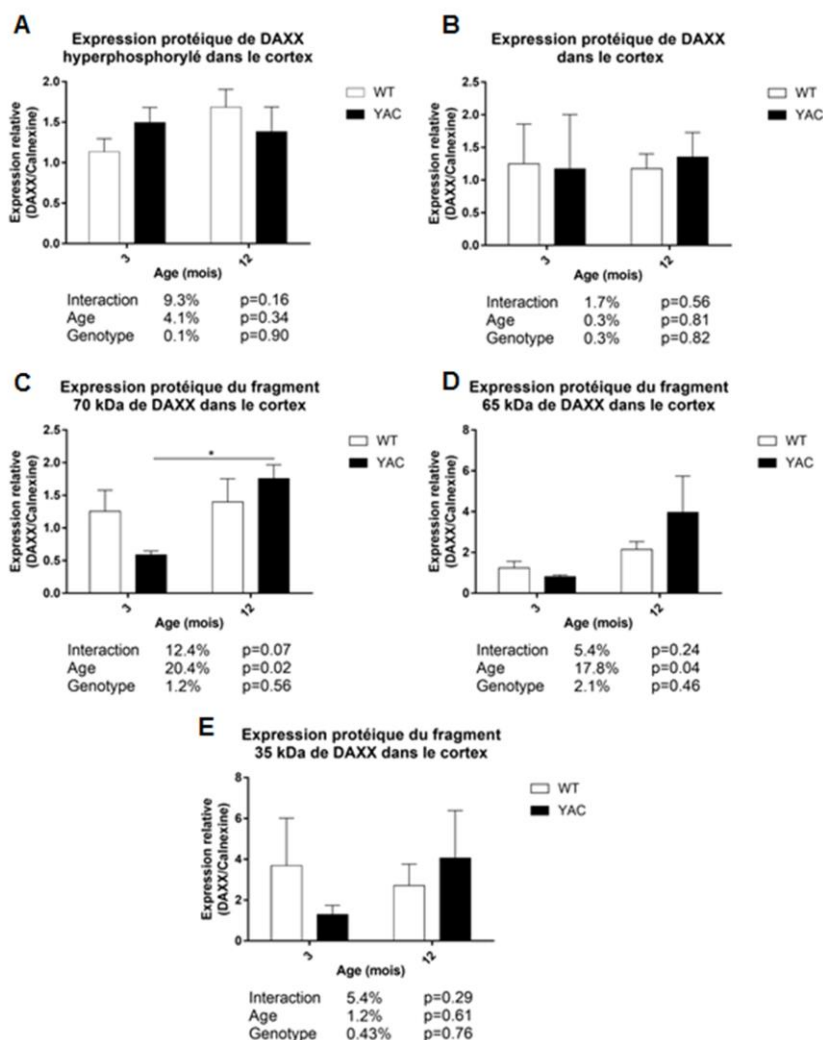
après l'apparition des symptômes de la maladie. Tel que présenté à la figure 1, aucune variation significative de l'ARNm de DAXX n'est observée dans le cortex et le cervelet tant à 3 mois que 12 mois (**Fig. 1**).

#### **Figure 1 Aucune variation de l'ARNm de DAXX chez les souris YAC128**

**A-B)** Aucun effet significatif de l'âge ou du génotype n'est détecté, tant dans le cortex que dans le cervelet. Les résultats d'ANOVA doubles voies (% de variance et valeur de p) sont inscrit sous leur graphique respectif. n=6 par catégories.

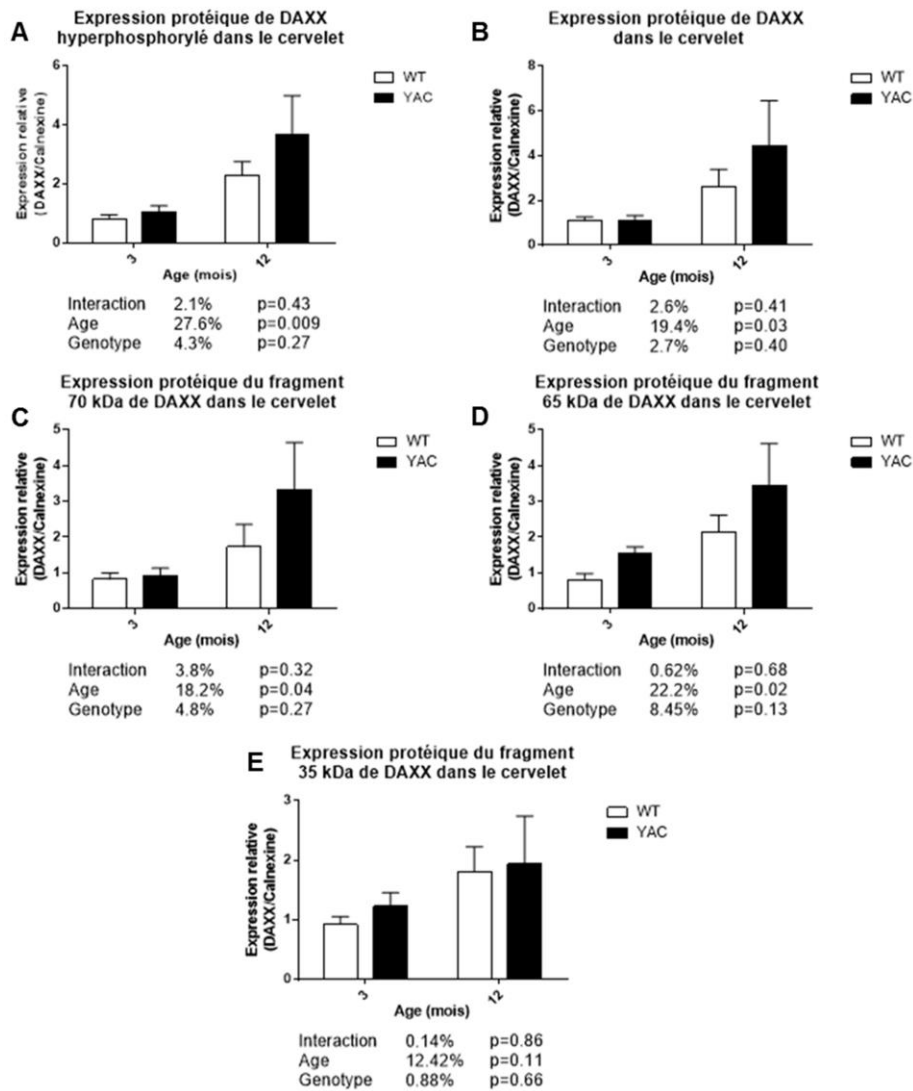
Considérant les multiples processus de régulation de l'expression au niveau protéique, il est plausible qu'une variation de l'expression protéique de DAXX soit altérée en absence d'une variation de l'expression génique. Dans le cortex, les immunobuvardages de type western ont révélé un effet de l'âge sur les niveaux protéiques de 2 des fragments de DAXX, soit les fragments à 70 et 65 kDa (comptant pour 20 à 17% de la variance totale) **(Fig. 2 et annexe 1, Fig.1)**. En effet, une augmentation significative de l'expression du fragment à 70 kDa entre 3 et 12 mois est observée en post hoc de type Tukey chez les YAC128 alors qu'une tendance à l'augmentation du fragment à 65 kDa est observée **(Fig. 2 C-D et annexe 1, Fig.1)**. Il est important de noter que l'analyse de l'expression de DAXX a été réalisée au sein des mêmes individus. Les échantillons tissulaires ont été homogénéisés avant la séparation de ceux-ci pour l'extraction d'ARNm et protéique afin d'éviter un effet de latéralité ou des différences selon les régions cérébrales prélevées dans les résultats. De façon similaire aux résultats d'ARNm obtenus dans le cortex, aucun effet du génotype n'est observé dans le cervelet **(Fig.1B)**. Cependant, un effet de l'âge a été détecté avec toutes formes protéiques de DAXX, sauf pour le fragment à 35 kDa, comptant pour 18 à 27% de la variation des données. Une augmentation de toutes ces formes est détectée avec l'âge dans le cervelet **(Fig. 3 et annexe 1, Fig.2)**.

Contrairement aux résultats obtenus dans les modèles murins de la maladie, une diminution significative de toutes les formes de DAXX est observée dans le cortex des individus atteints de la maladie de Huntington **(Fig. 4 et annexe 1, Fig.3)**. Par contre, dans le striatum, une diminution significative n'est détectée qu'avec le fragment à 65 kDa de DAXX **(Fig. 5 et annexe 1, Fig.4)**.



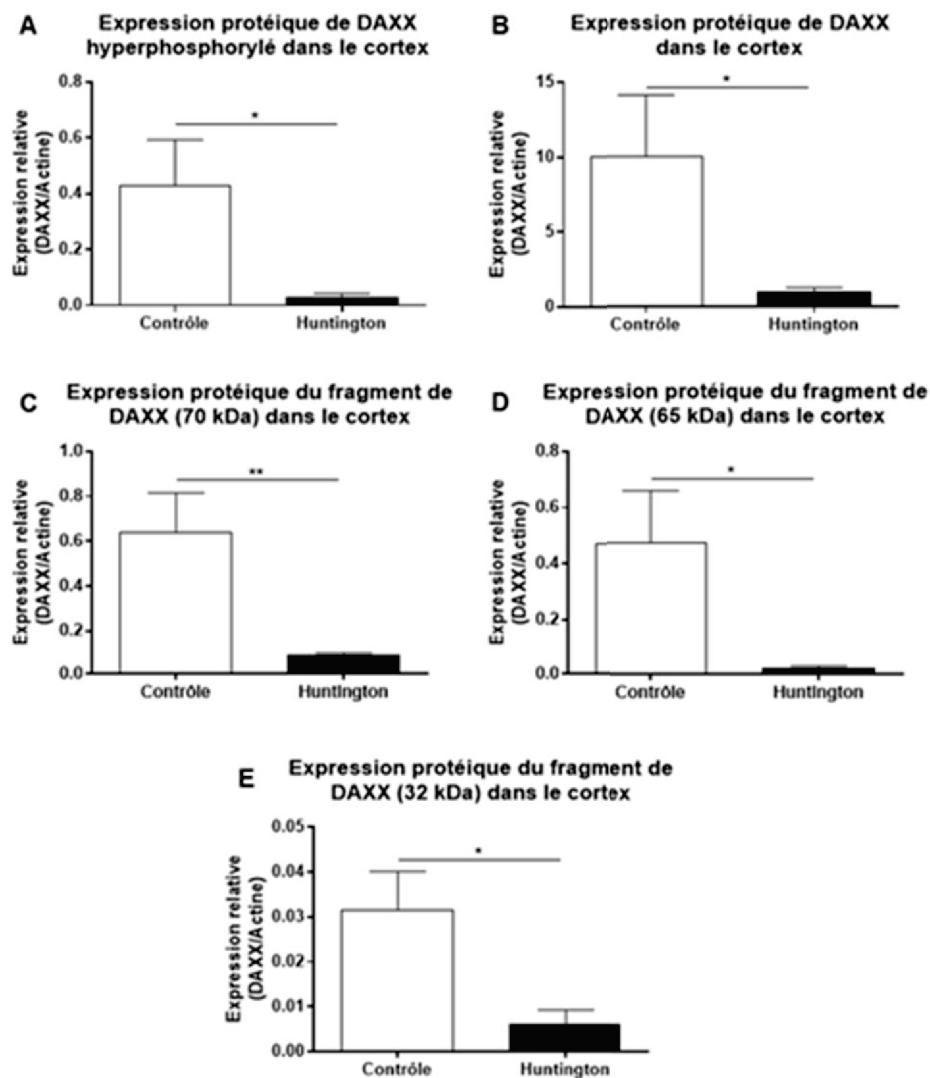
**Figure 2 Effet de l'âge sur l'expression de fragments de DAXX dans le cortex des souris YAC 128**

**A-B)** Aucune variation significative n'a été détectée en ANOVA doubles voies pour les formes entière et hyperphosphorylée de DAXX. **C-D)** Un effet de l'âge est observé en ANOVA doubles voies pour les fragments à 70 et 65 kDa. Ces deux fragments augmentent ou tendent à augmenter à 12 mois chez les YAC128. **E)** Aucune variation significative n'a été détectée en ANOVA doubles voies pour le fragment à 35 kDa de DAXX. Les résultats d'ANOVA doubles voies (% de variance et valeur de p) sont inscrit sous leur graphique respectif. Les analyses de comparaison multiple de type Tukey sont présentées par les lignes pleines sur les graphiques. n=6 par catégories.



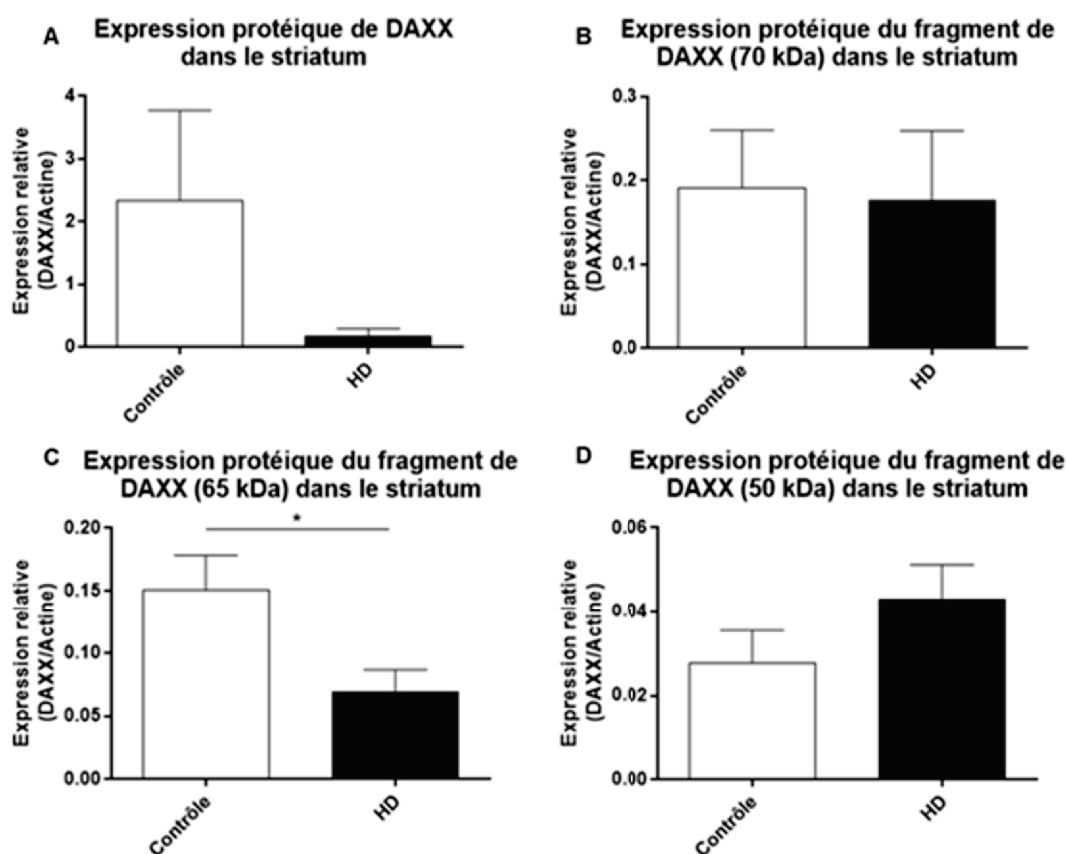
**Figure 3 Effet de l'âge sur l'expression de DAXX dans le cervelet des YAC 128**

A-E) Un effet de l'âge a été détecté avec toutes formes de DAXX, sauf pour le fragment à 35 kDa, comptant pour 18 à 27% de la variation des données. Une augmentation de toutes ces formes est détectée avec l'âge. Aucune variation significative n'est détectée avec le fragment à 35 kDa. Les résultats d'ANOVA doubles voies (% de variance et valeur de p) sont inscrit sous leur graphique respectif. Les analyses de comparaison multiple de type Tukey sont présentées par les lignes pleines sur les graphiques. n=6 par catégories.



**Figure 4 Diminution de DAXX et de ces fragments dans le cortex d'individu atteint de la maladie de Huntington**

A-E) Une diminution significative est détectée par t-test avec toutes les formes de DAXX dans le cortex d'individu atteint de la maladie de Huntington. Les t-tests sont représentées par des lignes pleines sur les graphiques. Les individus atteints de la maladie de Huntington étaient tous aux stades 3 ou 4 (stades tardifs). n=6 pour les contrôles et n=7 pour les cerveaux Huntington.



**Figure 5 Diminution du fragment à 65 kDa DAXX dans le striatum d'individus atteints de la maladie de Huntington**

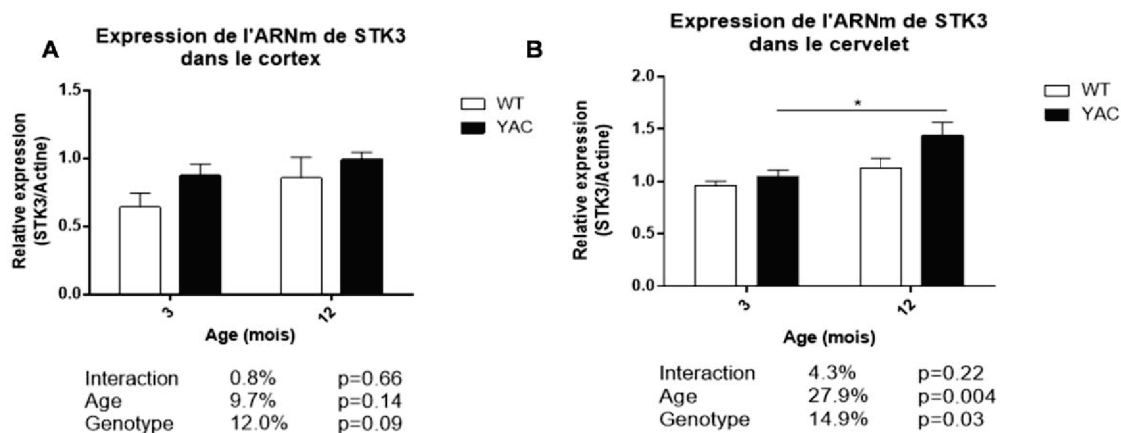
**A, B et D)** Aucune variation significative de l'expression de la protéine entière et des fragments à 70 et 50 kDa n'a été observée. Une diminution significative est détectée par t-test avec le fragment à 65 kDa de DAXX dans le striatum d'individus atteints de la maladie de Huntington. Les t-tests sont représentées par des lignes pleines sur les graphiques. Les individus atteints de la maladie de Huntington étaient tous au stade 3 ou 4 (stades tardifs). n=5 pour les contrôles et n=7 pour les cerveaux Huntington.

#### *Dérèglement de l'expression et du clivage de STK3 dans la maladie de Huntington*

De façon similaire à DAXX, l'expression génique de STK3 a été analysée par RT-PCR dans le cortex et le cervelet d'un modèle murin de la maladie, les souris YAC128 ayant été comparées aux souris de type sauvage à 3 et 12 mois. Dans le cortex, aucun effet du génotype ou de l'âge significatif sur l'expression de STK3 n'a été détecté en ANOVA à doubles voies. Par contre, il est intéressant de constater que la valeur de p associée à l'effet du génotype est inférieure à 0.1 et que cet effet, quoique non significatif, représente 12% de la variance dans ces échantillons (**Fig. 6**). L'analyse des niveaux d'ARNm de STK3 dans le

cervelet a révélé un effet du génotype et de l'âge significatif. Ces niveaux augmentent significativement entre 3 et 12 mois d'âge chez les YAC128 seulement (**Fig. 6**).

**Figure 6 Effets de l'âge et du génotype sur l'expression de l'ARNm de STK3 dans le**



#### cervelet chez les YAC128

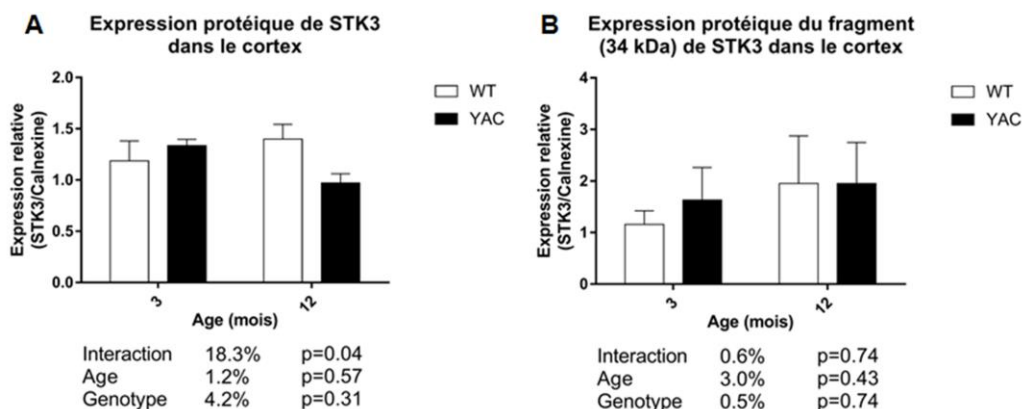
**A)** Aucun effet significatif de l'âge ou du génotype n'est détecté sur l'expression de STK3 dans le cortex chez les YAC128 comparé aux souris de type sauvage. **B)** Un effet de l'âge et du génotype est détecté sur l'expression de STK3 en ANOVA à doubles voies représentant 28 et 15% de la variance dans les échantillons respectivement. Son expression augmente entre 3 et 12 mois chez les YAC128 seulement. Les résultats d'ANOVA doubles voies (% de variance et valeur de p) sont inscrits sous leur graphique respectif. Les analyses de comparaison multiple de type Tukey sont présentées par les lignes pleines sur les graphiques. n=6 par catégories.

L'analyse de l'expression protéique de STK3 dans le cortex des souris YAC128 a révélé une interaction entre l'effet du génotype et de l'âge avec la forme entière seulement (**Fig. 7 et annexe 2, Fig. 1**). Une tendance à une diminution de l'expression de la forme entière est observée entre 3 et 12 mois chez les YAC128. Cependant, au niveau de l'expression du fragment à 34 kDa de STK3 aucune variation significative n'a été détectée par ANOVA doubles voies avec le fragment de STK3 (**Fig. 7**). Aucun effet significatif de l'âge ou du génotype n'est détecté dans le cervelet des souris YAC128 comparées aux souris de type sauvage, tant pour l'expression de la protéine entière que sur son fragment de 34 kDa (**Fig. 7 et annexe 2, Fig. 2**). Par contre, une tendance à un effet de l'âge est détectée sur l'expression de la forme entière de STK3 dans le cervelet (p=0.053) (**Fig. 8**).

Chez l'humain, une diminution de l'expression protéique de la forme entière et du fragment de STK3 est observée dans le cortex des individus atteints de la maladie lorsque comparé

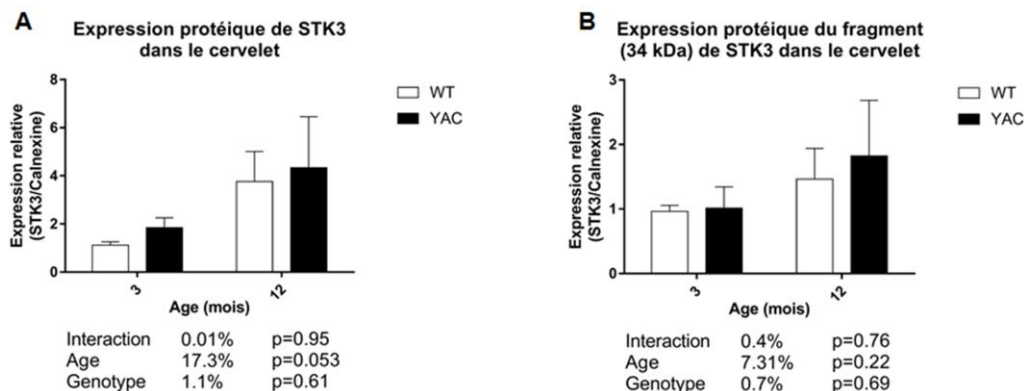


aux cerveaux contrôles. (Fig. 8 et annexe 2, Fig.4). Cependant, dans le striatum, aucune variation significative n'est observée.



**Figure 7 Aucun effet de l'âge et du génotype sur l'expression de STK3 dans le cortex des souris YAC128**

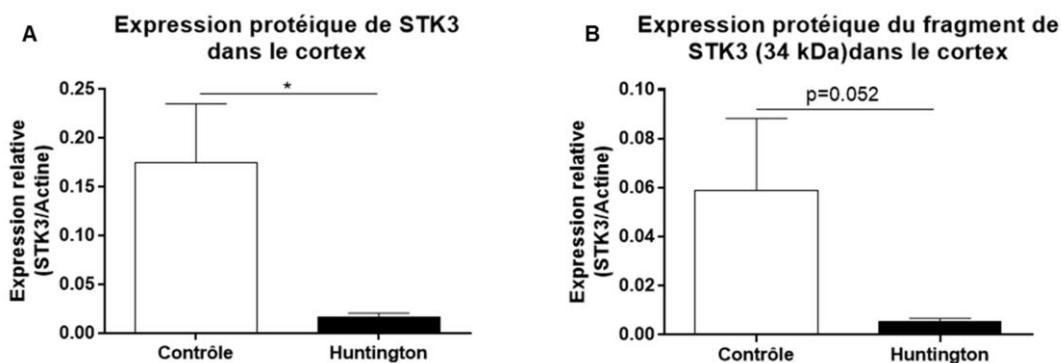
**A)** Une interaction significative entre l'effet du génotype et de l'âge sur l'expression protéique de la forme entière de DAXX. Une tendance à une diminution de l'expression de la forme entière de STK3 est observée entre 3 et 12 mois chez les YAC128 (t-test,  $p < 0.01$ ). **B)** Aucune variation significative n'est détectée en ANOVA doubles voies sur l'expression du fragment de 34 kDa de STK3. Les résultats d'ANOVA doubles voies (% de variance et valeur de p) sont inscrits sous leur graphique respectif. Les analyses de comparaison multiple de type Tukey sont présentées par les lignes pleines sur les graphiques.  $n=6$  par catégories.



**Figure 8 Aucun effet de l'âge et du génotype sur l'expression de STK3 dans le cervelet des souris YAC128**

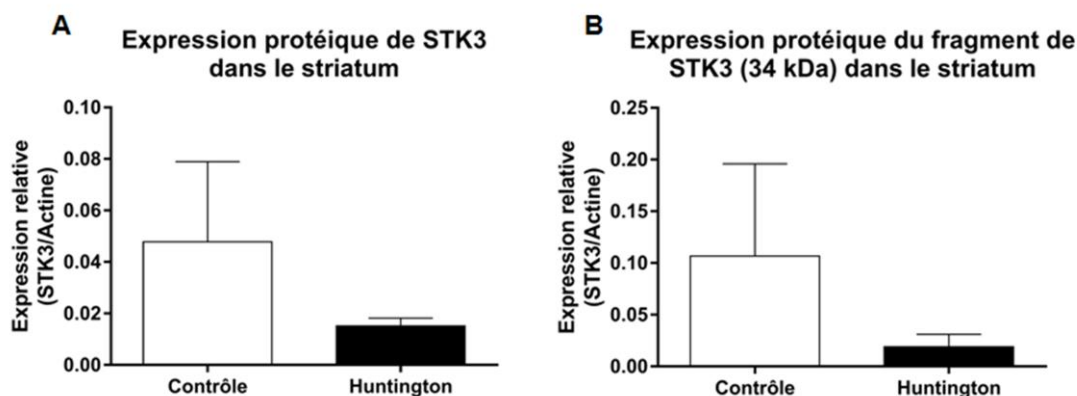
**A, B)** Aucun effet significatif de l'âge ou du génotype n'est détecté dans le cervelet chez les YAC128 comparé aux souris de type sauvage, tant pour l'expression de la protéine entière que sur son fragment. Par contre, une tendance à un effet de l'âge est détectée avec la forme entière de STK3 ( $p=0.053$ ). Les résultats d'ANOVA doubles voies (% de variance et valeur de p) sont inscrits sous leur graphique respectif. Les analyses de comparaison

multiple de type Tukey sont présentées par les lignes pleines sur les graphiques. n=6 par catégories.



**Figure 9 Diminution de l'expression de STK3 dans le cortex d'individu atteints de la maladie de Huntington**

**A, B)** Une diminution ou une tendance à une diminution de la forme entière et de fragment est détectée par t-test dans le cortex d'individus atteints de la maladie de Huntington. Les t-tests sont représentés par des lignes pleines sur les graphiques. Les individus atteints de la maladie de Huntington étaient tous aux stades 3 ou 4 (stades tardifs). n=5 pour les contrôles et n=7 pour les cerveaux Huntington.

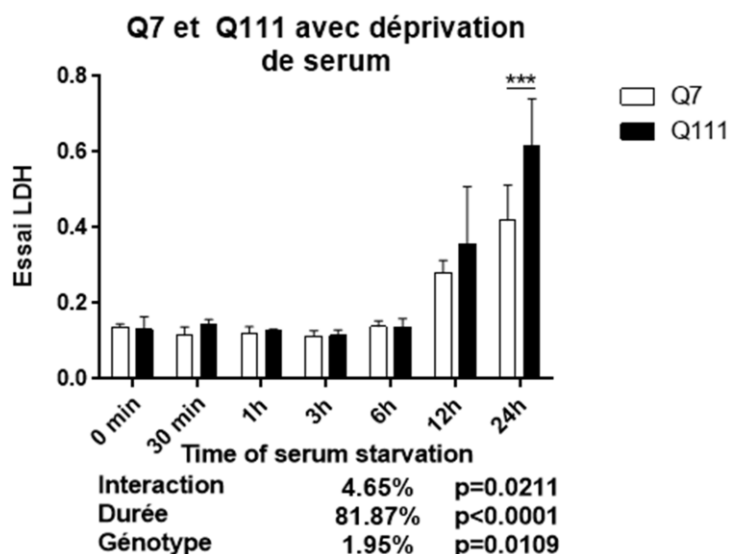


**Figure 10 Diminution de l'expression de STK3 dans le striatum d'individu atteints de la maladie de Huntington**

**A, B)** Aucune variation significative de l'expression de STK3 a été détectée dans le striatum des individus atteints de la maladie de Huntington. Les individus atteints de la maladie de Huntington étaient tous aux stades 3 ou 4 (stades tardifs). n=5 pour les contrôles et n=7 pour les cerveaux Huntington.

### ***Dérèglement de l'expression de DAXX et STK3 lors de stress cellulaires dans des modèles cellulaires de la maladie de Huntington***

Dans les sections précédentes, nous avons pu voir que l'expression de DAXX et STK3 semblent être altérée dans un modèle murin de la maladie de Huntington et chez les patients atteints de la maladie. Afin de mieux comprendre leur rôle dans cette maladie, leur expression a été analysée chez un modèle cellulaire neuronale de la maladie de Huntington, soit les Q7 (7 répétitions CAG) et Q111 (111 répétitions CAG). Tel qu'expliqué dans l'introduction, les cellules STHdhQ7/STHdhQ7 (Q7) et STHdhQ111/STHdhQ111 (Q111) sont des lignées cellulaires immortalisées extraites de la primordia striatale d'embryons de souris « knock-in » HdhQ7/HdhQ7 et HdhQ111/HdhQ111 respectivement. Afin de simuler les atteintes que ces cellules peuvent subir *in vivo*, l'expression de DAXX et STK3 a été analysée suite à l'induction de différents stress cellulaires. Le premier stress cellulaire choisi est la déprivation de sérum, puisqu'il a déjà été largement utilisé dans la littérature avec ce modèle cellulaire et qu'il induit une augmentation de la mort cellulaire évidente après quelques heures d'incubation (Kong *et al.*, 2009). La cytotoxicité du traitement a été d'ailleurs confirmée par essai LDH (Fig. 11). Les analyses en double voies indiquent un

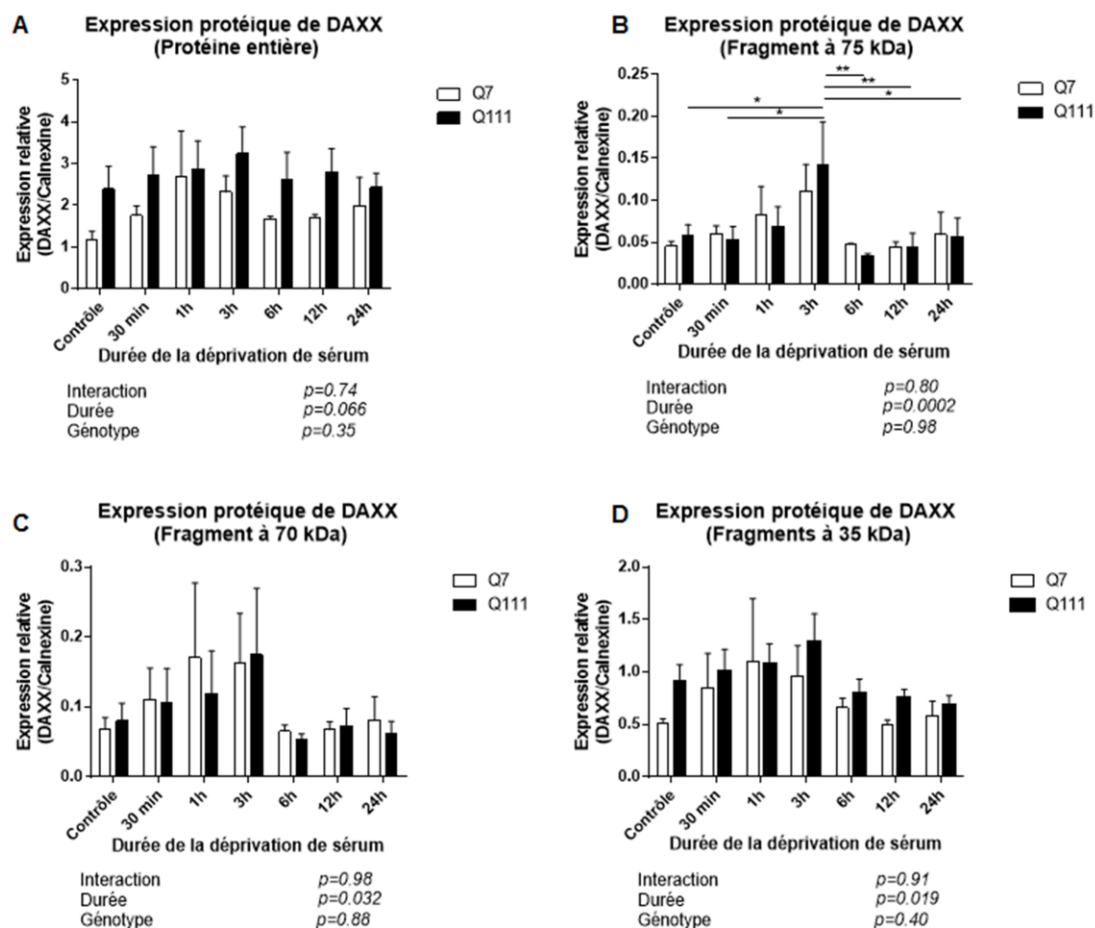


effet de la durée du traitement soit, une augmentation de la relâche de LDH dans le milieu cellulaire des cellules Q7 et Q111 après 12h de traitement. De plus, un effet du génotype est détecté. En effet, la relâche de LDH est supérieure chez les Q111 après un traitement de 24h comparé aux cellules Q7, suggérant un taux de mort cellulaire plus élevé chez les cellules Q111.

### Figure 11 Augmentation de la relâche de LDH dans le milieu cellulaire des cellules Q7 et Q111 suite à une déprivation de sérum

Un effet de l'âge, du génotype et une interaction entre ces deux facteurs ont été détectés sur la relâche de LDH en ANOVA double voie. La relâche de LDH commence à augmenter après 12h de stimulation et un taux supérieur de LDH est détecté dans le milieu des cellules Q111 comparé aux cellules Q7 après 24h de stimulation. Les résultats d'ANOVA doubles voies (% de variance et valeur de p) sont inscrit sous le graphique. Les analyses de comparaison multiple de type Sidak sont présentées par les lignes pleines sur les graphiques. n=5 par type cellulaire.

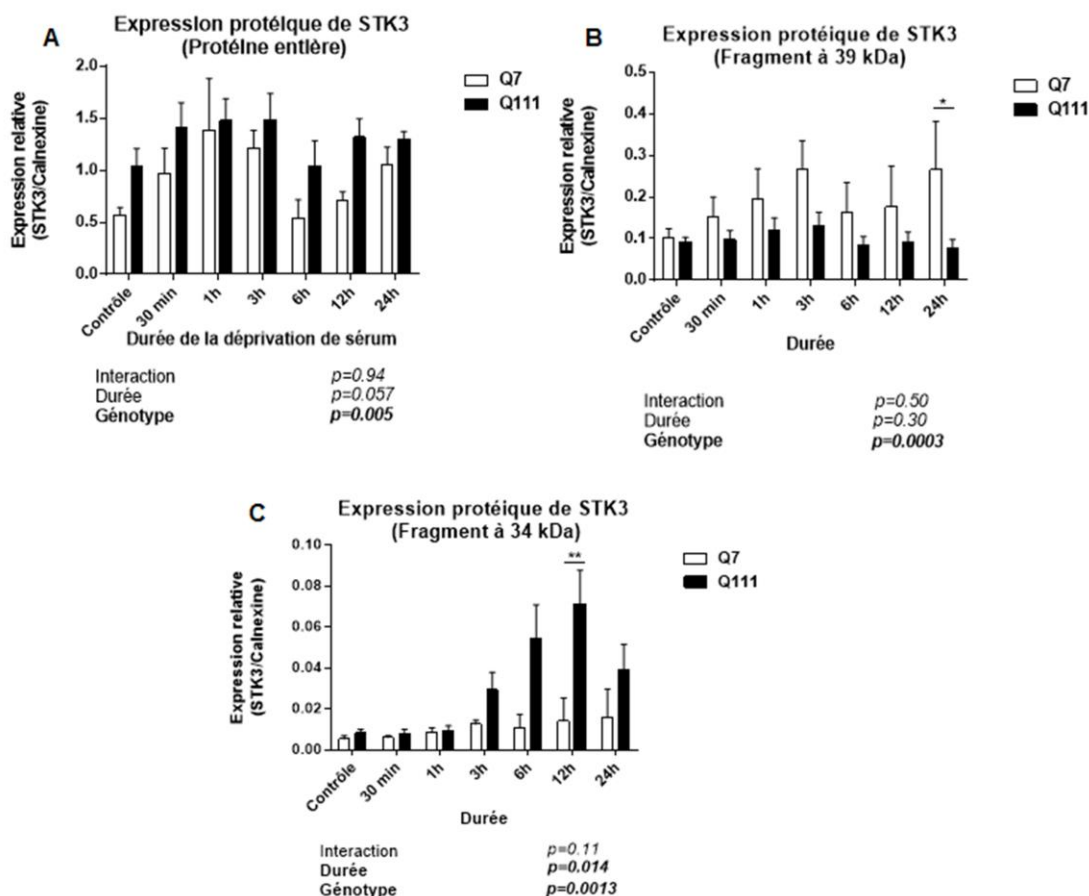
L'analyse en double voie de l'expression protéique de DAXX suite à la déprivation de sérum nous a permis de détecter un effet de la durée du traitement de nos lignées cellulaires. L'expression des fragments (75, 70 et 35 kDa) de DAXX tend à augmenter jusqu'à 3h de traitement dans les cellules Q7 et Q111 et diminue par la suite. Bien que l'expression de la protéine entière de DAXX tende à être supérieur chez les Q111 comparé au Q7, aucun effet du génotype n'a été détecté en ANOVA (Fig. 12).



### Figure 12 Augmentation du clivage de DAXX après 3h de déprivation de sérum chez les cellules Q7 et Q111

**A)** Aucune variation significative de l'expression de la protéine entière de DAXX n'est observée suite à la déprivation de sérum. **B-D)** Un effet de la durée du traitement est détecté en ANOVA doubles voies pour tous les fragments de DAXX. Par contre, aucun effet du génotype n'a été détecté. Les résultats d'ANOVA doubles voies (valeur de p) sont inscrit sous le graphique. Les analyses de comparaison multiple de type Sidak sont présentées par les lignes pleines sur les graphiques. Q7, n=3; Q111, n=6.

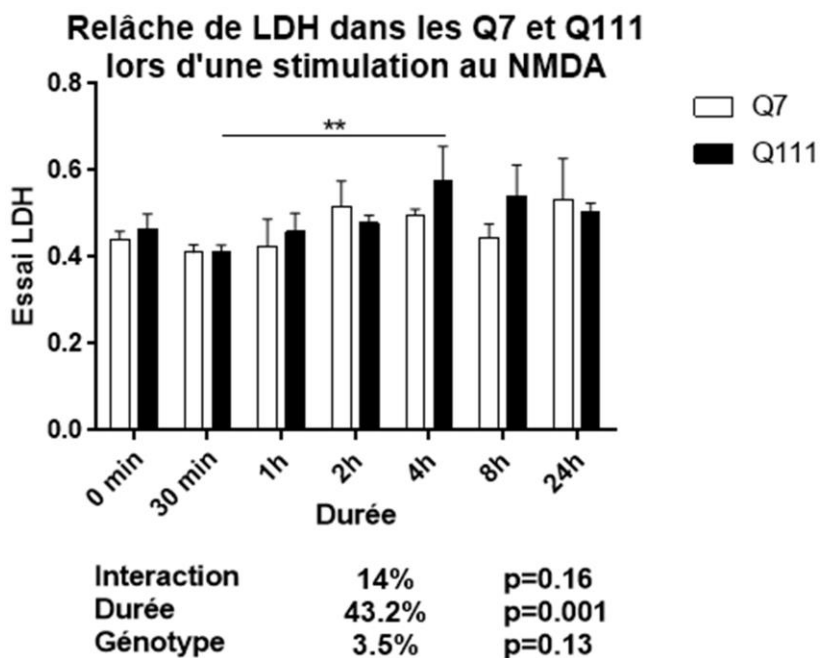
Contrairement à DAXX, un effet du génotype a été détecté sur l'expression de toutes les formes protéiques de STK3. L'expression de la protéine entière tend à être supérieur chez les Q111 comparé au Q7, même à 0 min de traitement. De plus, l'expression du fragment à 39 kDa augmente avec le traitement de façon supérieure chez les Q7 alors que l'expression du fragment à 34 kDa augmente plutôt chez les Q111. Ces résultats suggèrent des fonctions différentes de ces deux fragments dans la mort cellulaire (**Fig. 13B-C, Annexe 3, fig. 2**).



### **Figure 13 Clivage différentiel de STK3 selon le type cellulaire lors d'une déprivation de sérum**

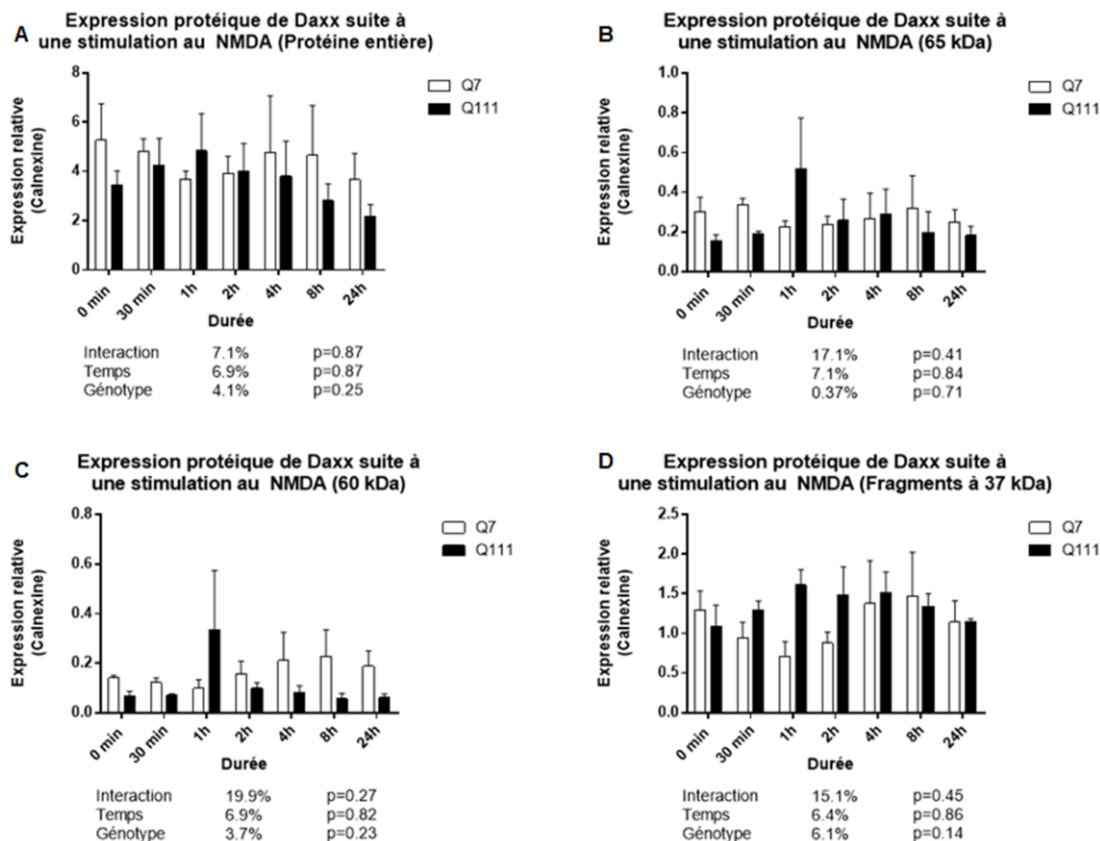
A) Un effet du génotype et une tendance à un effet de la durée du traitement est détecté sur l'expression de STK3 entier en ANOVA doubles voies. Les cellules Q111 possèdent une expression supérieure de la forme entière de STK3 que les cellules Q7. B) Un effet significatif du génotype est détecté avec le fragment à 39 kDa qui semble être exprimé de façon supérieure chez les cellules Q7. C) Un effet du génotype et de la durée du traitement est détecté avec le fragment à 34 kDa. L'expression de ce fragment augmente dans les cellules Q111 avec le traitement. Les résultats d'ANOVA doubles voies (valeur de p) sont inscrits sous le graphique. Les analyses de comparaison multiple de type Sidak sont présentées par les lignes pleines sur les graphiques. Q7, n=3; Q111, n=6.

Par la suite, nous avons voulu analyser l'expression de DAXX et STK3 dans le cadre d'une stimulation plus représentative des atteintes observées dans la maladie de Huntington. Pour ce faire, nous avons choisi la stimulation au NMDA, un traitement largement utilisé afin de simuler l'excitotoxicité régulièrement observée dans les maladies neurodégénératives. L'analyse de la cytotoxicité par l'essai LDH nous a permis de confirmer une tendance à l'augmentation de la relâche de LDH dans le milieu cellulaire suggérant une augmentation de la mort cellulaire (**Fig. 14**). Suite à la stimulation au NMDA, aucune variation significative de l'expression de DAXX ou de ses fragments n'a été détectée en ANOVA double voie (**Fig. 15**). Pour ce qui est de STK3, un effet du génotype a été détecté sur l'expression des fragments de STK3. Contrairement à la déprivation de sérum, l'expression des deux fragments (39 et 34 kDa) augmente chez les cellules Q7 comparées aux cellules Q111, dans lesquelles l'expression reste au niveau basal tout le long du traitement NMDA (**Fig. 15, Annexe 3, fig. 2**).



**Figure 15 Augmentation de la relâche de LDH dans le milieu des cellules Q7 et Q111 suite à la stimulation au NMDA**

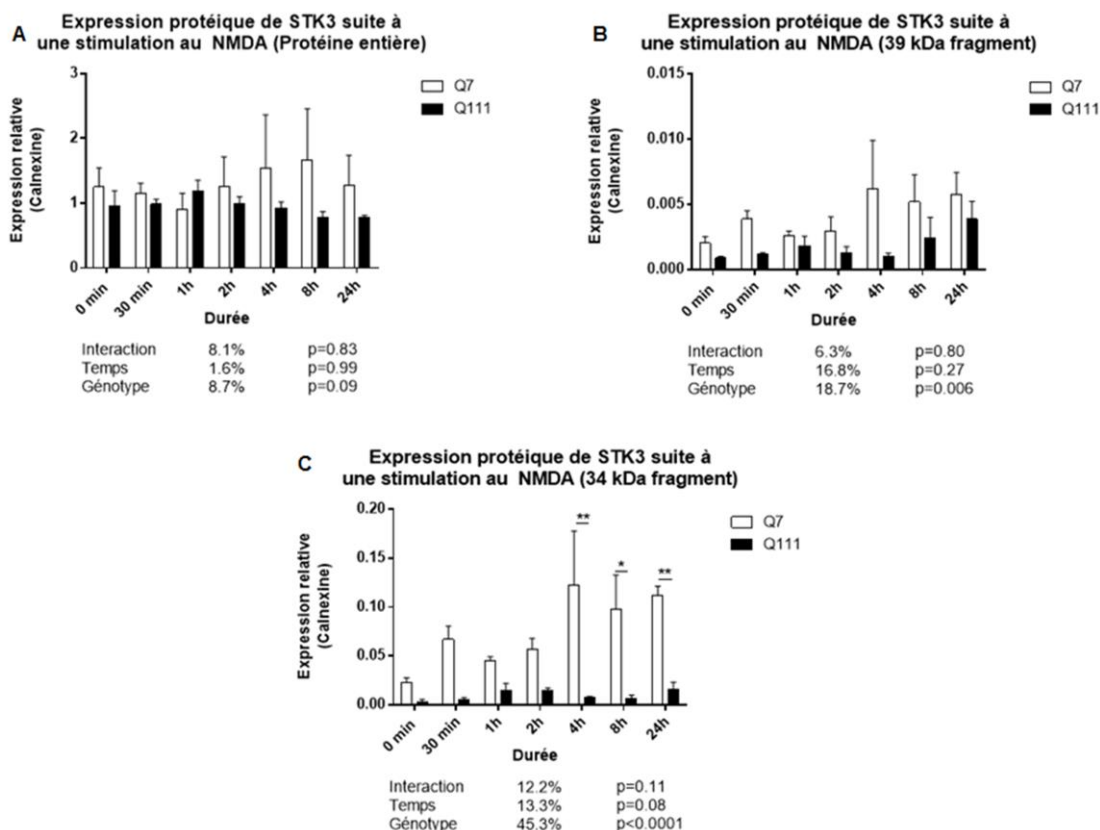
Un effet du traitement a été détecté en ANOVA double voie et la relâche de LDH commence à augmenter après 4h de stimulation. Les résultats d'ANOVA doubles voies (% de variance et valeur de p) sont inscrits sous le graphique. Les analyses de comparaison multiple de type Sidak sont présentées par les lignes pleines sur les graphiques. n=5 par type cellulaire.



**Figure 16** Aucune variation significative de l'expression de DAXX suite à une stimulation au NMDA

**A-D)** Aucune variation significative de l'expression de DAXX n'est détectée en ANOVA doubles voies dans les cellules Q7 et Q111 suite à la stimulation au NMDA. Les résultats d'ANOVA doubles voies (% de variance et valeur de p) sont inscrit sous le graphique. Les analyses de comparaison multiple de type Sidak sont présentées par les lignes pleines sur les graphiques. n=3 par type cellulaire.





**Figure 15 Augmentation du clivage de STK3 dans les cellules Q7 suite à une stimulation au NMDA**

**A)** Aucune variation significative de l'expression de la protéine entière n'est détectée. **B-C)** Un effet du génotype est détecté avec l'expression des fragments à 39 et 34 kDa dont l'expression est supérieure dans les cellules Q7 comparées aux Q111. Les résultats d'ANOVA doubles voies (% de variance et valeur de p) sont inscrit sous le graphique. Les analyses de comparaison multiple de type Sidak sont présentées par les lignes pleines sur les graphiques. n=3 par type cellulaire.

## DISCUSSION

### **Analyse des phénomènes apoptotiques dans les processus du vieillissement**

Tel qu'expliqué plutôt dans ce mémoire, caspase 6 possède un rôle crucial dans la maladie de Huntington et d'autres maladies neurodégénératives tel que la maladie d'Alzheimer. Nous avons donc voulu investiguer le rôle de certains substrats de ces caspases dans les maladies neurodégénératives et le comparer à leurs rôles dans le vieillissement normal. Suite à des expériences de double hybride en levure et d'analyses de sites de clivage effectués précédemment, nous avons ciblé deux substrats de la caspase 6, STK3 et DAXX. Ces substrats ont été choisis selon leur présence au niveau cérébral, leurs fonctions dans la mort cellulaire et la présence d'interaction avec des protéines impliquées dans des maladies neurodégénératives. L'expression de 4 différentes caspases a aussi été analysée lors de cette étude. Les 3 caspases exécutrices (3, 6 et 7) ainsi qu'une caspase initiatrice a été investiguées afin de comprendre la relation entre la présence des fragments de DAXX et STK3 avec l'expression de ces caspases et les phénomènes apoptotiques.

Nous avons d'abord investigué l'expression et l'activité de diverses caspases et de substrats de caspases (STK3 et DAXX) dans le vieillissement à travers divers organes murins provenant tous des mêmes individus. Dans la dernière partie de ce mémoire, nous avons investigué l'expression de STK3 et DAXX dans des régions cérébrales de souris modèles de la maladie de Huntington et d'humains atteints de la maladie. Nous avons aussi tenté d'élucider le rôle de ces protéines au sein de la maladie à l'aide de modèles cellulaires de la maladie. L'investigation du rôle de ces substrats dans la maladie de Huntington permettra de mieux comprendre la mort neuronale dans la maladie de Huntington et sa différence avec la neurodégénérescence observé normalement avec le vieillissement. De plus, les résultats obtenus dans les lignées cellulaires modèles de la maladie de Huntington nous permettent d'approfondir nos connaissances sur l'excitotoxicité et son influence au niveau cellulaire dans la maladie.

### ***Expression de DAXX dans le vieillissement***

Dans le cadre du premier article présenté dans ce mémoire, nous avons pu démontrer pour la première fois le clivage de DAXX par la caspase-3 et confirmer son clivage par la

caspase-6. Nous avons aussi constaté que caspase-6 clive DAXX avec plus d'efficacité que la caspase-3. La production de ces fragments par la caspase 3 et 6 pourrait constituer un important critère affectant les fonctions intracellulaires de DAXX puisqu'il a déjà été proposé dans des études *in vitro* que des fragments ou mutants de délétion de DAXX possèderaient un rôle dans la mort cellulaire (Yang *et al.*, 1997). Étant donné les divers résultats contradictoires concernant les fonctions de DAXX, l'étude de la production et du rôle de ces fragments est une avenue intéressante et pourrait aider à clarifier les différentes fonctions de DAXX (Zhong *et al.*, 2000, Chen & Chen, 2003, Salomoni & Khelifi, 2006, Lindsay *et al.*, 2009).

Lors de l'analyse de l'expression de DAXX, nous avons constaté une discordance entre l'expression de l'ARNm et des formes protéiques. En effet, malgré une tendance générale à une diminution de son ARNm dans le foie, le rein, le coeur, le cortex et le cervelet, l'expression protéique de la majorité des formes augmente dans le rein, le coeur et le cortex. Dans le foie et la rate, certains fragments tendent à augmenter avec l'âge alors que d'autre reste stable. La discordance entre ces résultats pourrait être due à une altération de la demi-vie de DAXX, telle qu'observée lors de la phosphorylation de DAXX par ASK1 menant à l'accumulation de DAXX dans la cellule (Fukuyo *et al.*, 2009). De plus, il a déjà été soulevé dans la littérature que la dégradation par le protéasome est altérée avec l'âge (Carrard *et al.*, 2002, Breusing & Grune, 2008a, Li & Li, 2011, Baraibar & Friguet, 2012). De la discordance entre l'expression des différentes formes protéique de DAXX est aussi remarqué dans ces résultats. Plus particulièrement, dans le striatum et le cervelet, certaines formes ou fragments augmentent alors que d'autres diminuent avec le vieillissement suggérant ainsi un effet différentiel du vieillissement sur les différentes protéases clivant DAXX.

### ***Expression de STK3 dans le vieillissement***

Dans le cadre du deuxième article présenté dans ce mémoire, nous avons analysé le clivage de STK3 par la caspase-3, 6 et 7. Bien que le clivage de STK3 par caspase 3 et 6 en déjà été décrit dans la littérature, leur efficacité n'avait jamais été comparée (Lee *et al.*, 2001, Graham *et al.*, 2012). Nous avons pu constater que les caspases 3 et 7 clivent STK3 à de

plus faibles concentrations de caspase recombinante que la caspase 6. Par contre, la caspase 6 semble produire un fragment à 39 kDa qui lui est spécifique.

Lors de l'analyse de l'expression, nous avons pu constater que l'expression protéique de STK3 et/ou de ses fragments tend à augmenter dans tous l'organisme avec l'âge. Par contre, l'expression de l'ARNm de STK3 dans le foie, le cœur et le cortex ne suit pas cette tendance. En effet, une diminution de l'ARNm est observée dans ces organes, suggérant, tout comme DAXX, l'accumulation des formes protéiques avec l'âge ainsi qu'une diminution de leur dégradation. Il a déjà été démontré dans la littérature que STK3 ainsi que son fragment à 34 kDa possèdent des fonctions proapoptotiques ou anti-prolifératives et il a été soulevé que STK3 jouerait un rôle dans la mort neuronale, notamment dans la maladie d'Alzheimer via la protéine c-abl (Liu, Wu, *et al.*, 2012, Alvarez *et al.*, 2004, Zhou *et al.*, 2011, Heallen *et al.*, 2011, Praskova *et al.*, 2008). Hors, l'augmentation de son expression à travers l'organisme entier pourrait être le reflet de la mort cellulaire, l'arrêt de prolifération et l'entrée dans cellules en sénescence à travers l'organisme avec l'âge.

### ***Expression des caspases dans le vieillissement***

Les différentes caspases analysées ne suivent pas le même patron d'expression avec le vieillissement. En effet, l'expression protéique de caspase 8 augmente dans tous les tissus analysés alors que les caspases 3, 6 et 7, trois caspases exécutrices, voient leur expression augmenter ou diminuer selon le tissu. Ces résultats d'expression des caspases à travers le vieillissement suggèrent une certaine précaution quant à l'effet de ce stress physiologique au niveau moléculaire. En effet, chaque organe ayant une fonction et une organisation complètement différente, des éléments particuliers sont à prendre en considération lors de l'étude des phénomènes proapoptotiques au sein de chaque organe analysé.

De plus, les études des différents systèmes sont, la majorité du temps, investiguées séparément par des groupes de recherche, des techniques ainsi que sur des organismes complètement différents. Or, plusieurs différences interespèces ou intercolonies peuvent exister (Garcia-Menendez *et al.*, 2013, Lessard-Beaudoin *et al.*, 2015). Dans ce présent projet, nous avons analysé l'expression de diverses protéines impliquées dans la mort cellulaire y compris plusieurs caspases à travers 4 différents organes périphériques et 4 régions cérébrales chez les mêmes individus. De ce fait, il est plus facile de faire une

comparaison entre les différents systèmes puisque les résultats proviennent des mêmes individus, mêmes espèces, races et âge.

Il est important de noter que certaines caspases, telles que caspase-8, possèdent des fonctions non apoptotiques en plus de ses fonctions proapoptotiques (Ben Moshe *et al.*, 2007). De ce fait, il est important de ne pas faire l'association entre expression des caspases et apoptose trop rapidement. Par exemple, dans le foie, une diminution de l'expression protéique de caspase-3 et 6 est observée dans le vieillissement alors qu'une augmentation est détectée avec l'expression de caspase-8. Comme un bas taux de mort cellulaire a été précédemment observé dans le foie (Suh, 2002a), l'activation de la caspase-8 pourrait donc être attribuée aux fonctions non apoptotiques de cette protéase dans le foie tel que la prolifération et l'induction de l'inflammation (Ben Moshe *et al.*, 2007). On peut se poser la même question pour les autres organes puisqu'une augmentation générale de caspase-8 a été remarquée dans l'ensemble de l'organisme avec le vieillissement. Pour cette raison, l'analyse de l'expression de diverses molécules proapoptotique telle que certains homologues Bcl2 ou p53 serait intéressante afin de confirmer ou d'infirmer l'enclenchement des cascades apoptotique dans chacun des organes.

### ***Activité des caspases avec le vieillissement***

Dans cette étude, très peu de corrélation a été trouvée entre l'expression de fragments actifs des caspases et leurs activités. Tel que déjà soulevé d'en certains articles, l'utilisation de substrats peptidiques fluorescents est de plus en plus mitigé (McStay *et al.*, 2008). En plus de la potentielle présence d'inhibiteurs (exogènes ou endogènes relâchés lors de l'homogénéisation cellulaire) qui peut influencer les résultats, le manque de spécificité des substrats peptidiques disponibles pour les essais d'activité requiert une certaine précaution quant à l'interprétation des résultats (McStay *et al.*, 2008). Il est aussi à noter que le substrat AcDEVD-Afc est aussi le substrat de la caspase-7 et qu'aucun substrat peptidique spécifique à cette caspase n'existe actuellement (McStay *et al.*, 2008). Or, les résultats d'essai d'activité de caspase-3, réalisé avec ce substrat, doivent être interprétés en tenant compte de cette lacune.

### **Analyse des altérations de DAXX dans la maladie de Huntington**

DAXX a pour partenaire d'interaction différentes protéines impliquées dans la maladie de Huntington, tel CREB-binding protein (Kuo *et al.*, 2005, Giralt *et al.*, 2012). De plus, son clivage par la caspase-6, protéase clé dans la maladie de Huntington, son implication dans la mort cellulaire ainsi que son rôle suggéré dans la maladie d'Alzheimer fait de DAXX une cible intéressante pour cette maladie (Niu *et al.*, 2011, Graham *et al.*, 2012, Mateos *et al.*, 2012). Contrairement à l'augmentation de l'ARNm détecté précédemment chez l'humain, aucune variation de l'expression de l'ARNm de DAXX n'a été détecté dans le cortex et le cervelet de souris YAC128 de 3 et 12 mois comparée au souris de type sauvage (Riechers *et al.*, 2016a). En revanche, l'expression protéique de DAXX dans le cervelet et des fragments à 65 et 70 kDa de DAXX dans le cortex augmente avec l'âge chez les YAC128. Or, l'expression du fragment à 70 kDa de DAXX augmentait dans le cortex lors du vieillissement chez les souris C57BL/6. L'augmentation de ce fragment entre les souris YAC128 pré et post-symptomatiques pourrait être une accélération du phénomène observé à <30 mois chez les souris C57BL/6. De plus, ce résultat est observé chez les YAC128 seulement et une tendance à une interaction entre l'effet de l'âge et du génotype est observée avec le fragment à 70 kDa. Malgré la variation de ce fragment dans le vieillissement et la maladie de Huntington, aucune protéase n'est reconnue pour produire ce fragment. Les seules protéases reconnues pour cliver DAXX à ce jour sont les caspases-3 et -6 ainsi qu'une protéase L du « Foot-and-mouth disease virus » (Pineiro *et al.*, 2012a).

Dans le cervelet des souris YAC128, une augmentation avec l'âge comptant pour 18 à 27% de la variance des résultats a été observée avec toutes les formes protéiques de DAXX sauf pour le fragment à 35 kDa. Par contre, ces résultats ne semblent pas être similaires à ceux observés dans notre étude sur le vieillissement chez les souris C57BL6 puisqu'une diminution de l'expression de DAXX entier et du fragment à 70 kDa avait été observée. Cette discordance entre les résultats chez les WT FVB et C57BL6 pourrait soulever des différences dans le cervelet entre les souris FVB, race de laquelle proviennent les YAC128, et les souris C57BL/6 utilisées dans notre étude sur le vieillissement.

Contrairement à ce qui a été observé chez nos modèles murins de la maladie de Huntington, l'expression de DAXX diminue dans le cortex des patients atteints de la maladie de Huntington. Il faut par contre prendre en considération plusieurs facteurs pour l'analyse de ce résultat : (1) les échantillons ont été récoltés après le décès d'individu étant dans des stades avancés de la maladie, (2) l'âge au décès se situe entre 43 et 73 ans, ce qui correspond à un âge plus avancé que nos souris YAC128 post-symptomatiques (3) l'échantillon provient d'une région spécifique du cortex alors que chez la souris, un homogénat de cortex entier a été utilisé. En tenant compte de ces facteurs, il est plausible que DAXX augmente dans les stades précoces de la maladie puis diminue dans les derniers stades. Il serait aussi possible que la région précise qui nous a été donnée ait subi une diminution de l'expression de DAXX alors que d'autres régions démontreraient une augmentation de son expression. Lorsque tout le cortex est prélevé, comme chez les souris, ces différences seraient ainsi diluées pour avoir un effet net d'augmentation de l'expression. Finalement, dans le striatum humain, nous avons seulement observé une diminution de l'expression du fragment de DAXX à 70 kDa. Bien que l'expression de DAXX n'ait pas encore été analysée dans le striatum des souris YAC128, il est intéressant de noter que ce fragment semble être particulièrement altéré dans la maladie de Huntington. En effet, l'expression du fragment de DAXX à 70 kDa est altérée dans le cortex des souris YAC128 et d'individus atteints de la maladie.

Nous avons ensuite analysé l'expression de DAXX dans un modèle cellulaire de la maladie de Huntington, soit les lignées neuronales Q7 et les Q111, incubées sous différents stress cellulaires (déprivation de sérum et stimulation au NMDA). Nous avons pu constater que bien qu'un effet de la durée de la déprivation de sérum ait été détecté sur l'expression de DAXX, aucun effet entre les génotypes n'a été détecté. L'expression des fragments de DAXX semble augmenter à 3h en absence de sérum puis diminue par la suite. En revanche, la stimulation au NMDA ne semble pas provoquer d'altération de l'expression de DAXX entre les différents temps de traitements et entre les deux types cellulaires. Il se pourrait donc que DAXX soit impliqué dans le contrôle entre la survie et la mort cellulaire de façon précoce suivant le retrait du sérum, mais ne soit pas impliqué dans les processus d'excitotoxicité mimés avec le NMDA. Il est toutefois à noter que l'expression de la forme

entière de DAXX ne varie pas de façon significative avec les deux types de traitement. L'expression de sa forme entière ne semble donc pas être impliquée directement dans la mort cellulaire suite à ces traitements. Cependant, il est aussi possible qu'une altération dans d'autres modifications post-traductionnelles (phosphorylation, ubiquitination) ou de localisation intracellulaire de DAXX soit présente et ne soit pas reflétée dans son niveau d'expression (Tang *et al.*, 2013, Fukuyo *et al.*, 2009, Lin *et al.*, 2006, Song & Lee, 2004a, Ecsedy *et al.*, 2003, Jang *et al.*, 2002).

### **Analyse des altérations de STK3 dans la maladie de Huntington**

L'analyse de l'ARNm de STK3 révèle une augmentation de l'expression de STK3 dans le cervelet avec l'âge chez les YAC128 alors qu'aucune variation significative n'est observée dans le cortex. L'effet de l'âge observé sur les niveaux d'ARNm dans le cervelet se reflète au niveau protéique puisqu'une tendance à l'augmentation de la protéine entière de STK3 est détectée. Cette tendance est similaire à l'augmentation de l'expression de STK3 qui a été observée dans le cortex et le cervelet des souris C57BL/6 lors du vieillissement. Dans le cortex, une interaction entre l'effet de l'âge et du génotype a été détectée. En effet, l'expression de la protéine entière tend à diminuer chez les souris YAC128 alors qu'elle reste stable chez les souris de type sauvage. Ce résultat semble discordant avec ceux obtenus lors de nos études sur le vieillissement, qui démontraient que STK3 augmentait dans le cortex. Il serait donc possible que la voie de STK3 soit altérée dans le cortex lors de la maladie de Huntington alors que dans le cervelet, seulement l'effet du vieillissement normal de l'organisme affecterait l'expression de STK3 entre 3 et 12 mois.



			<u>Vieillessement</u> <u>C57BL6</u>	<u>Huntington</u> <u>YAC128</u>
Murin	Cortex	ARNm	↓	-
		Protéine	↑	↓
	Cervelet	ARNm	-	↑
		Protéine	↑	↑
Humain	Cortex	Protéine	X	↓
	Striatum	Protéine	X	-

**Table 1. Résumé des résultats d'expression de STK3 dans la maladie de Huntington.** Les flèches indiquent les variations d'expression de STK3 dans les tissus murins (C57BL6 ou YAC128) ou humains. Les « X » signifient que le résultat n'a pas encore été obtenu et les « - » indiquent une absence de variation de l'expression de STK3.

De façon similaire à ce qui est observé chez les souris YAC128, une diminution de l'expression de la protéine entière de STK3 et une tendance à la diminution de son fragment est observée dans le cortex d'individu atteint de la maladie de Huntington. En revanche, aucune variation n'est détectée dans le striatum. Il serait aussi intéressant d'analyser l'expression de l'ARNm de STK3 dans ces échantillons cérébraux puisqu'une augmentation de l'ARNm de STK3 a été observée précédemment dans le cerveau d'individus atteints de la maladie (Riechers *et al.*, 2016b).

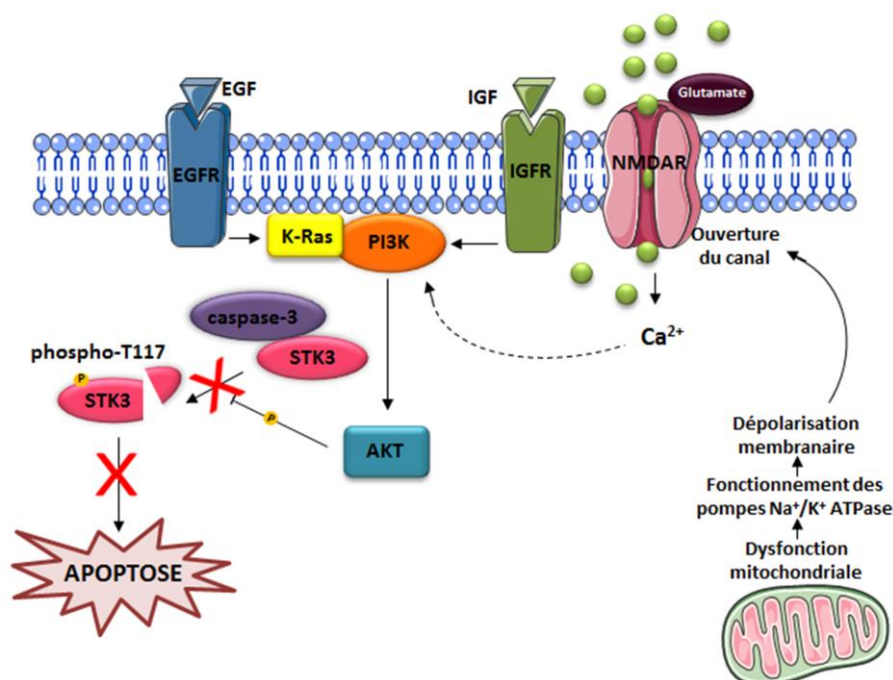
Afin de mieux comprendre le rôle de STK3 dans la maladie de Huntington, l'expression protéique de STK3 a également été analysée dans les cellules Q7 et Q111 suite à une déprivation de sérum et une stimulation au NMDA. En absence de sérum, nous avons pu constater un taux supérieur de STK3 entier et de son fragment à 34 kDa après 12h de traitement dans les cellules Q111 comparativement aux cellules Q7. Par contre, une augmentation du fragment à 39 kDa a été observée dans les cellules Q7. Cette différence d'expression entre les deux fragments pourrait suggérer des fonctions différentes réalisées par ces deux fragments, tels qu'observés avec MST1, un homologue de STK3 (Song & Lee, 2008). En effet, le fragment de 40 kDa de MST1 active la voie de JNK et p38 alors que le fragment de 36 kDa active ERK (Song & Lee, 2008). Ces résultats ont ensuite été comparés à ceux obtenus avec un stress cellulaire plus représentatif de ce qui est observé dans la maladie de Huntington. L'excitotoxicité est un des processus importants pour le développement de cette maladie. Ce processus est défini comme étant la stimulation

prolongée des neurones par des acides aminés excitateurs, tel que le glutamate. Nous avons donc stimulé le récepteur NMDA, un récepteur glutamatergique ionotropique, afin de mimer ce phénomène d'excitotoxicité. De façon surprenante, un effet du génotype est observé sur les niveaux de STK3 lors de la stimulation au NMDA, mais cette fois-ci, une augmentation des 2 fragments de STK3 (34 et 39 kDa) est observée dans les cellules Q7 alors que le niveau reste faible tout le long du traitement chez les cellules Q111. La voie de STK3 ne semble donc pas être affectée de la même façon avec la déprivation de sérum et la stimulation au NMDA.

		<u>Protéine entière</u>	<u>Fragment (39kDa)</u>	<u>Fragment (34kDa)</u>
Déprivation de sérum	Q7	↑	↑↑↑	-
	Q111	↑↑↑	↑	↑↑↑
Stimulation au NMDA	Q7	-	↑	↑↑↑
	Q111	-	-	-

**Table 2. Résumé des résultats d'expression protéique de STK3 lors de deux stimulations cellulaires différents** Les variations indiquées sont comparées aux contrôles. Le signe « - » correspond à une absence de variation.

En 2003, un article a démontré la suractivation de la voie PI3K/AKT dans les cellules Q111 et que cette suractivation protégeait les cellules de la mort cellulaire induite par une incubation avec du NMDA (Fig. 17) (Gines, Ivanova, *et al.*, 2003). De plus, il est à noter qu'AKT phosphoryle STK3 sur la T117 inhibant ainsi le clivage par la caspase-3 (Kim et al., 2010). Or, si STK3 se retrouve plus phosphorylé dans les Q111 que les Q7, il serait alors normal de voir une augmentation de clivage seulement dans les Q7 suivant la stimulation au NMDA. D'un autre côté, la voie de PI3K/AKT est aussi activée par des récepteurs au facteur de croissance, tels EGFR et IGFR (Gora-Kupilas & Josko, 2005). Lors de la déprivation de sérum, ce signal est retiré et pourrait déstabiliser la voie et mener à une diminution de la phosphorylation de STK3 sur la T117. De cette façon, en absence de sérum, le mécanisme adaptatif neuroprotecteur dans les cellules Q111 est déstabilisé et STK3 pourrait alors être clivé.



**Figure 17. Mécanisme adaptatif des cellules STHdhQ111 suite à la suractivation prolongée du récepteur NMDA**

L'activation prolongée du récepteur NMDA mène à une suractivation de la voie PI3K/AKT via l'entrée de calcium et son interaction avec la Calmoduline. La voie ainsi activée favorise la prolifération et la survie cellulaires en stabilisant entre autres la voie de  $\beta$ -caténine. AKT phosphoryle STK3 sur la T117. Ce site de phosphorylation résulte en l'inhibition du clivage de STK3 par la caspase-3.

Ce mécanisme adaptatif pourrait aussi expliquer l'absence de variation de clivage de STK3 dans le cortex et le cervelet des souris YAC128 et la diminution de l'expression du fragment à 34 kDa de STK3 dans le cortex des individus atteints de la maladie de Huntington alors qu'une augmentation du clivage de STK3 est observée avec le vieillissement. L'augmentation de la phosphorylation de STK3 sur la T117 dans la maladie de Huntington pourrait empêcher ce clivage. Bien sûr, cette hypothèse reste à confirmer dans nos lignées cellulaires. L'analyse de la phosphorylation d'AKT dans nos échantillons cérébraux murins et lors de stress cellulaire sera à envisager afin de mieux comprendre le rôle de STK3 dans la maladie de Huntington et l'effet de la suractivation de la voie PI3K/AKT sur le clivage de STK3.

## CONCLUSION

En conclusion, notre étude suggère que l'expression de deux nouveaux substrats de la caspase-6, DAXX et STK3, est altérée dans les processus du vieillissement. Nous avons démontré le clivage de ce premier par les caspases 3 et 6 et du second par les caspases 3, 6 et 7. De plus, nos résultats démontrent que le patron d'expression protéique et d'ARNm des différentes caspases et leur activité respective varient fortement à travers l'organisme et même au sein du même organe (tel qu'observé avec les différentes régions cérébrales) suggérant des effets différentiels du vieillissement sur les mécanismes apoptotiques ou sur les fonctions non apoptotiques des caspases. De plus, d'après nos résultats préliminaires sur la maladie de Huntington, nous avons constaté que l'expression de DAXX et STK3 diminue dans le cortex d'individus atteints de la maladie de Huntington et que l'expression de STK3 varie dans le cortex des souris YAC128. Par l'utilisation de deux stress cellulaires distincts sur les cellules Q7 et Q111, nous avons aussi observé que le clivage de STK3 est influencé différemment selon le génotype et selon le stress cellulaire utilisé. En effet, le clivage de STK3 lors de stress cellulaire semble être sous l'influence de la voie PI3K/AKT qui, en guise de mécanisme neuroprotecteur, serait suractivée dans les cellules Q111. Cette hypothèse sera investiguée par notre laboratoire par l'analyse de l'expression et de la phosphorylation d'AKT ainsi que par des traitements avec un inhibiteur de la voie PI3K/AKT. Cette étude contient d'importantes informations concernant la compréhension des processus apoptotiques à travers l'organisme entier dans le processus du vieillissement. De plus, l'investigation du rôle de STK3 dans la maladie de Huntington et de son implication dans les mécanismes adaptatifs sous-jacent à cette maladie est cruciale afin de cibler le moment favorable pour l'administration de diverses molécules thérapeutiques.

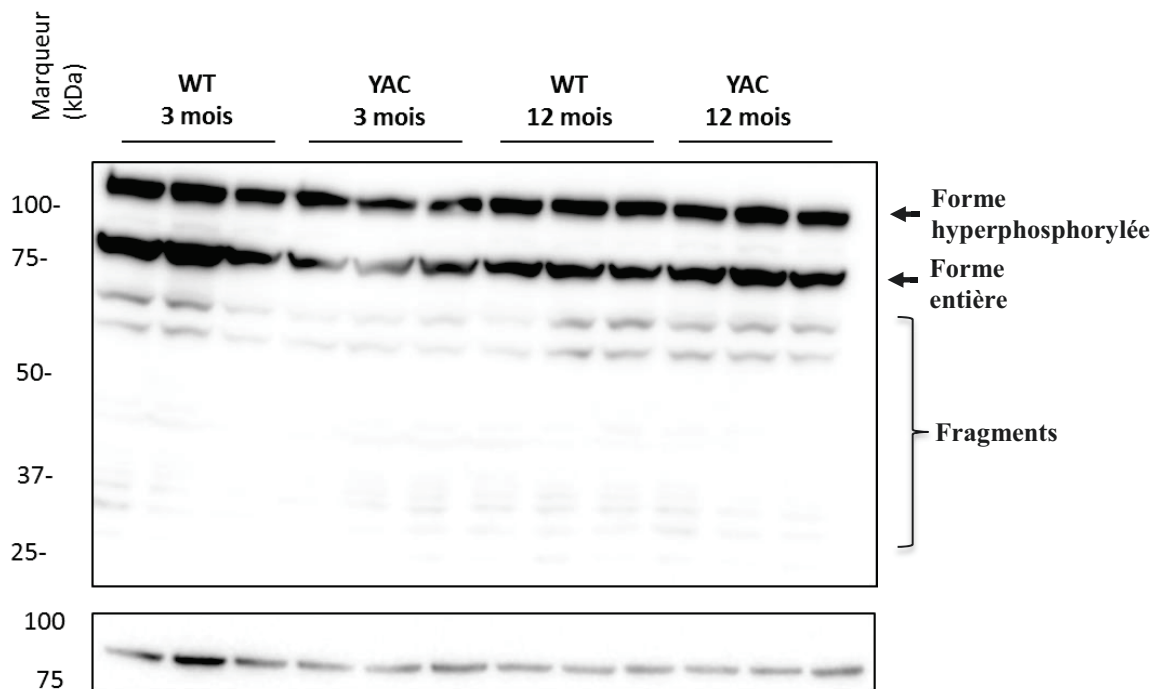
## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier Pre Rona K. Graham pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, ainsi que pour son support, sa compréhension et ses bons conseils. Je tiens à la remercier sincèrement pour la confiance qu'elle m'a témoignée tout au long de mes études graduées. Elle a permis de me développer à mon plein potentiel et de me faire découvrir des compétences que je ne pensais même pas posséder. Je tiens aussi à remercier Marie-Josée Demers, assistante de recherche et Amal Loudghi, stagiaire dans le laboratoire, pour leur aide sur mon projet ainsi que pour tous les fous rires et les bons moments passés en leur compagnie. Je remercie aussi Mélissa Laroche, étudiante à la maîtrise dans le laboratoire, pour nos nombreuses discussions, son amitié et son support dans les hauts et les bas des dernières années. Je remercie Pre Christine Lavoie, mon mentor, pour ses bons conseils ainsi que les membres du Centre de recherche sur vieillissement de Sherbrooke et de la Faculté de médecine et des sciences de la santé que j'ai côtoyées ces dernières années.

De plus, je tiens à remercier ma famille, plus spécialement ma mère Francine Lessard, ma sœur Mylène Lessard-Beaudoin ainsi que mon conjoint Samuel Corriveau pour leurs soutiens, leurs encouragements, leur compréhension et pour leur patience phénoménale au cours de ces dernières années. Merci!

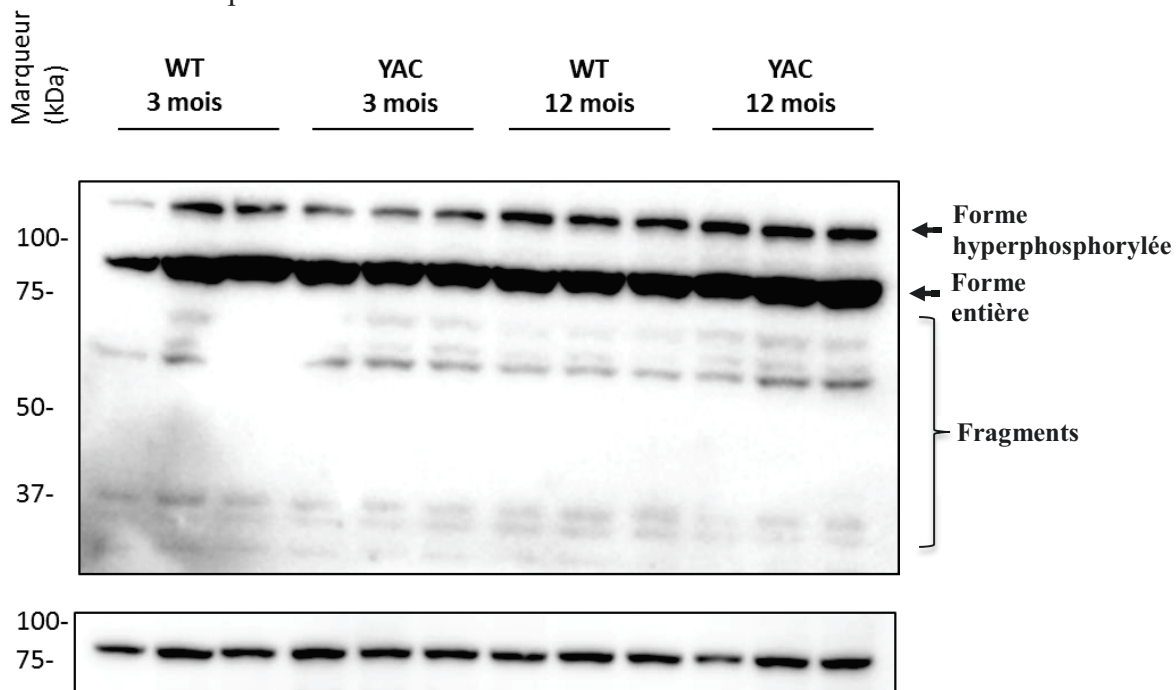
Finalement, je remercie Pre Christine Lavoie et Pre Mélanie Plourde pour avoir accepté réviser ce mémoire ainsi que la faculté de médecine et des sciences de la santé, le Centre de recherche sur le vieillissement, les Fonds de recherche en santé du Québec et les Instituts de recherche en santé du Canada pour l'octroi de mes bourses de maîtrise.

## ANNEXE 1: WESTERN BLOT DE DAXX



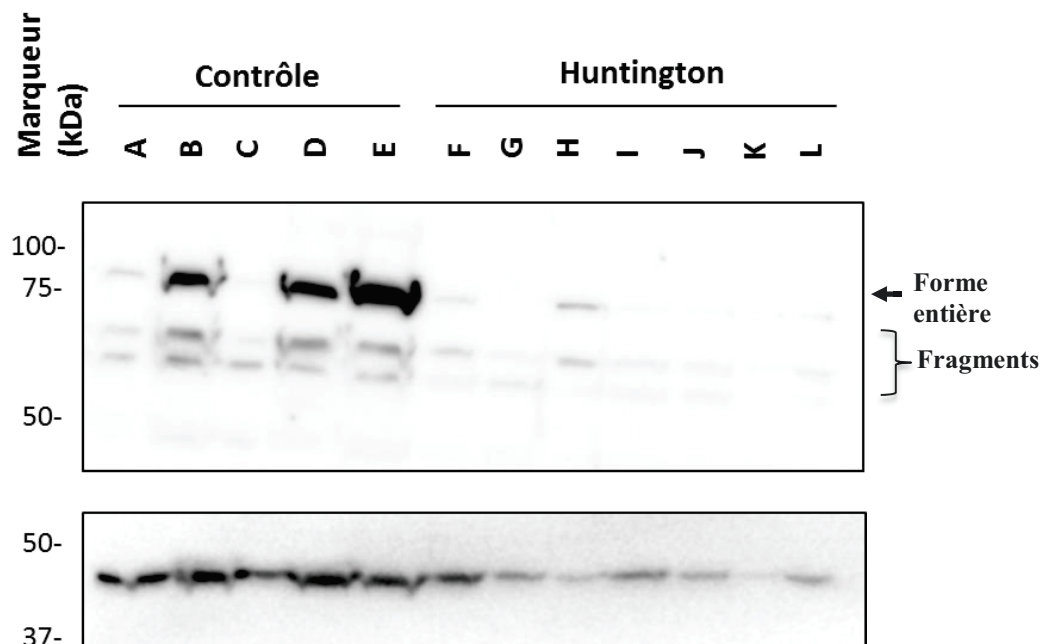
**Figure 1. Immunobuvardage de DAXX dans le cortex des souris YAC128**

Exemple d'immunobuvardage de STK3 (panneau du haut). Calnexine (panneau du bas) a été utilisé comme protéine de référence.



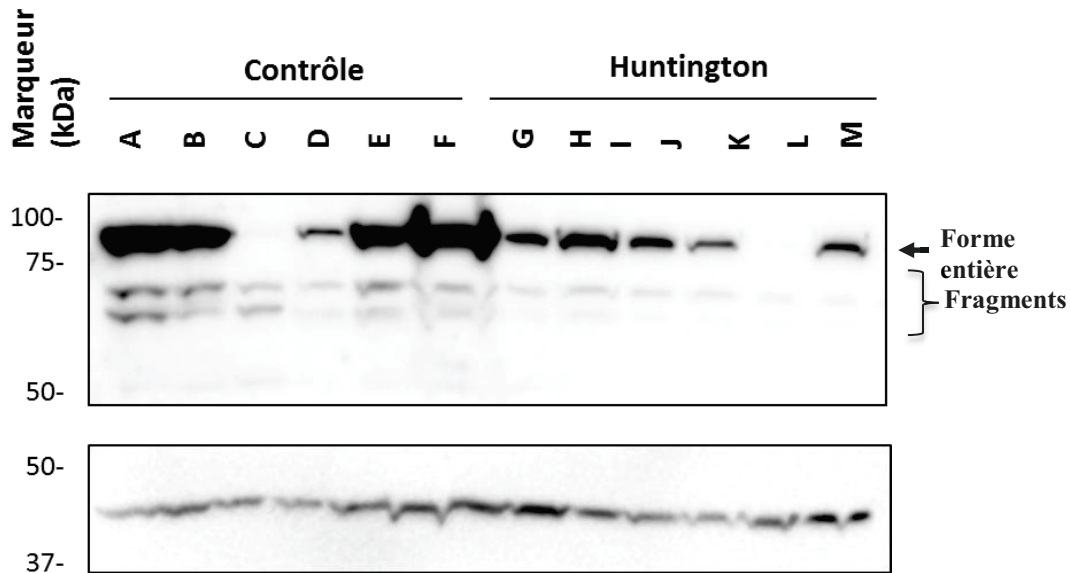
**Figure 2. Immunobuvardage de DAXX dans le cervelet des souris YAC128**

Exemple d'immunobuvardage de STK3 (panneau du haut). Calnexine (panneau du bas) a été utilisé comme protéine de référence.



**Figure 4. Immunobuvardage de DAXX dans le striatum d'individus atteints de la maladie de Huntington**

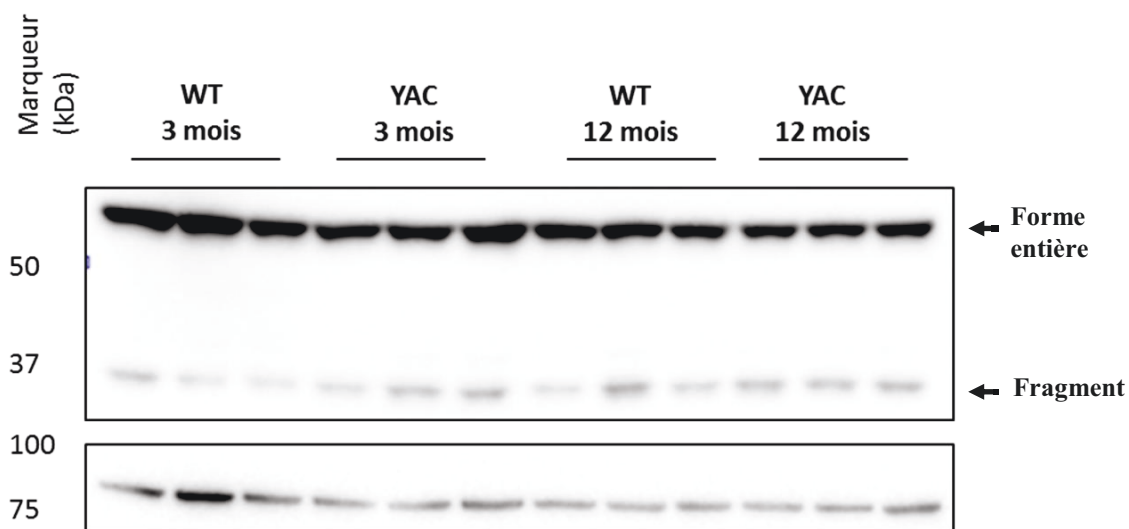
Exemple d'immunobuvardage de DAXX (panneau du haut).  $\beta$ -actine (panneau du bas) a été utilisé comme protéine de référence.



**Figure 5. Immunobuvardage de DAXX dans le cortex d'individus atteints de la maladie de Huntington**

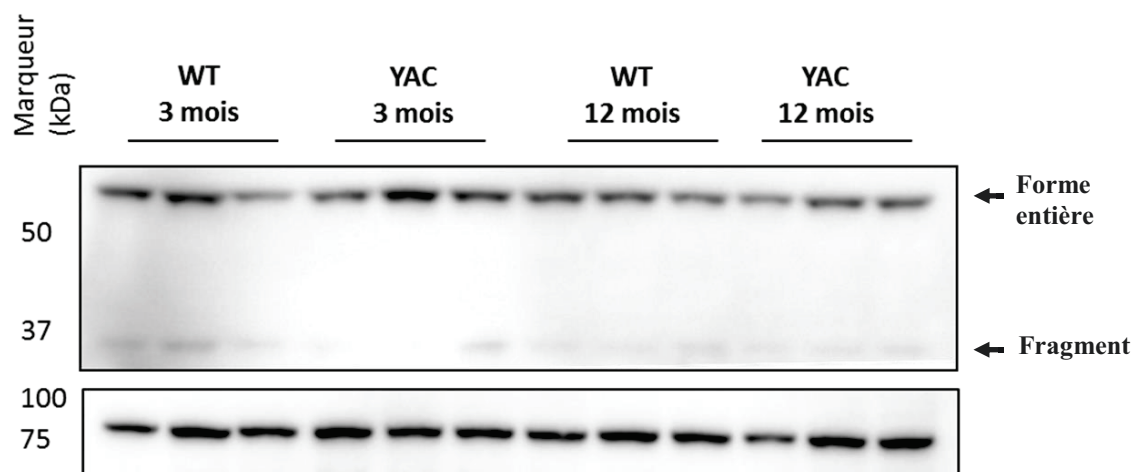
Exemple d'immunobuvardage de DAXX (panneau du haut).  $\beta$ -actine (panneau du bas) a été utilisé comme protéine de référence.

## ANNEXE 2: WESTERN BLOT DE STK3



**Figure 1. Immunobuvardage de STK3 dans le cortex des souris YAC128**

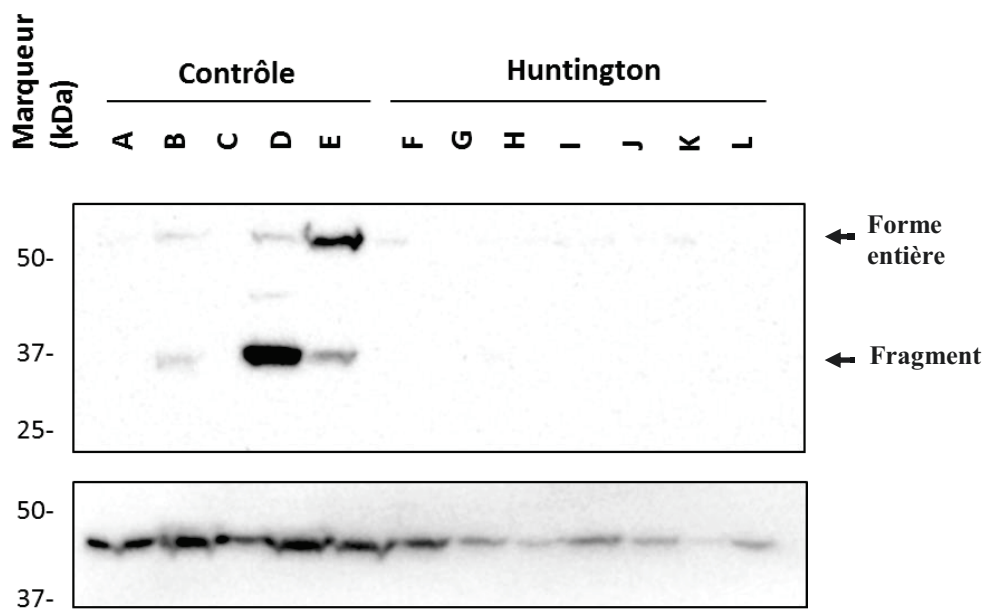
Exemple d'immunobuvardage de STK3 (panneau du haut). Calnexine (panneau du bas) a été utilisé comme protéine de référence.



**Figure 2. Immunobuvardage de STK3 dans le cervelet des souris YAC128**

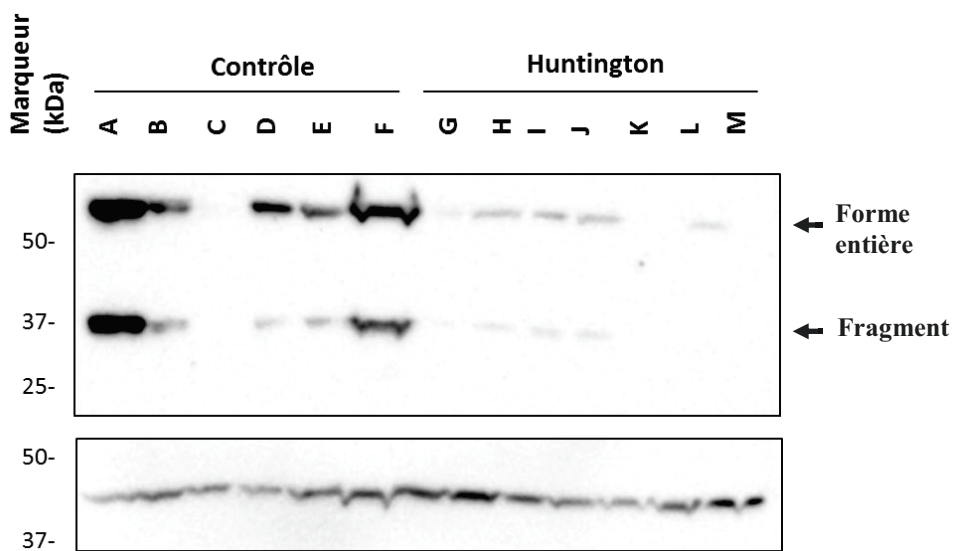
Exemple d'immunobuvardage de STK3 (panneau du haut). Calnexine (panneau du bas) a été utilisé comme protéine de référence.





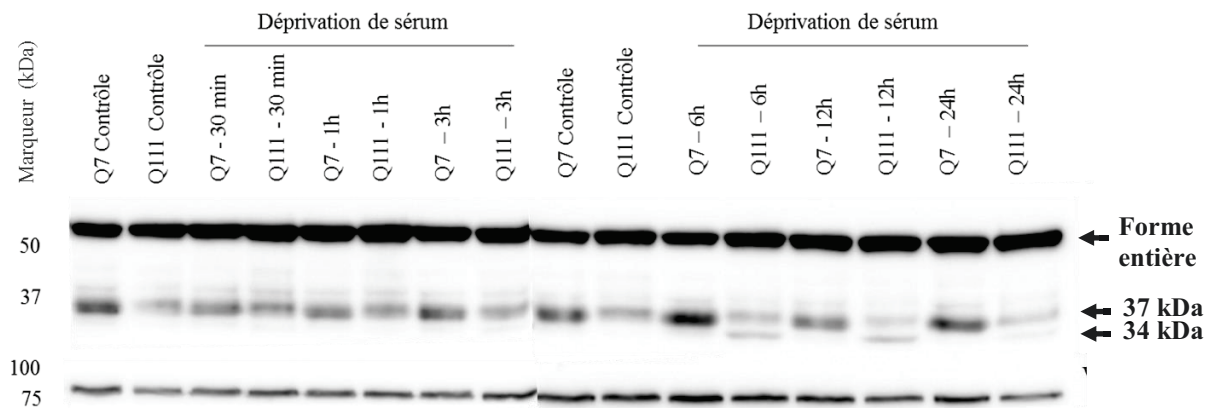
**Figure 3. Immunobuvardage de STK3 dans le striatum d'individus atteints de la maladie de Huntington**

Exemple d'immunobuvardage de STK3 (panneau du haut).  $\beta$ -actine (panneau du bas) a été utilisé comme protéine de référence.



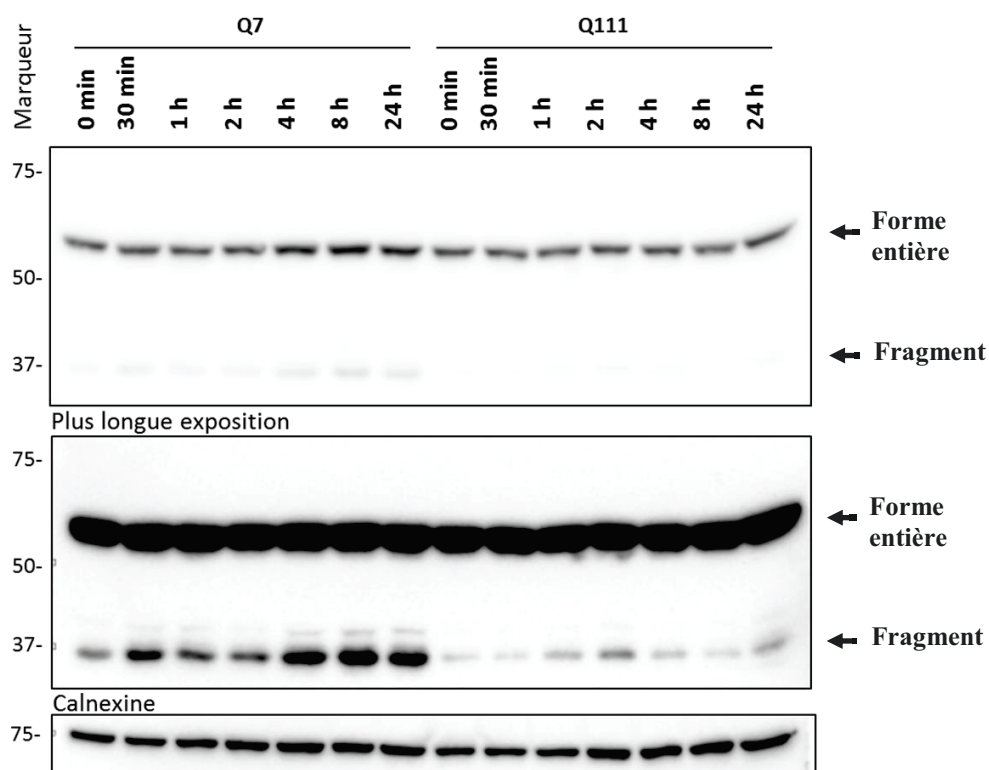
**Figure 4. Immunobuvardage de STK3 dans le cortex d'individus atteints de la maladie de Huntington**

Exemple d'immunobuvardage de STK3 (panneau du haut).  $\beta$ -actine (panneau du bas) a été utilisé comme protéine de référence.



**Figure 5. Immunobuvardage de STK3 lors d'une déprivation de sérum chez les cellules Q7 et Q111**

Exemple d'immunobuvardage de STK3 (panneau du haut). Calnexine (panneau du bas) a été utilisé comme protéine de référence.



**Figure 6. Immunobuvardage de STK3 lors d'une stimulation des cellules Q7 et Q111 au NMDA**

Exemple d'immunobuvardage de STK3 (panneau du haut). Calnexine (panneau du bas) a été utilisé comme protéine de référence.

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Akterin, S., Cowburn, R. F., Miranda-Vizueté, A., Jimenez, A., Bogdanovic, N., Winblad, B. & Cedazo-Minguez, A. (2006a). *Cell death and differentiation* **13**, 1454-1465.
- Akterin, S., Cowburn, R. F., Miranda-Vizueté, A., Jimenez, A., Bogdanovic, N., Winblad, B. & Cedazo-Minguez, A. (2006b). *Cell Death Differ* **13**, 1454-1465.
- Albrecht, S., Bourdeau, M., Bennett, D., Mufson, E. J., Bhattacharjee, M. & LeBlanc, A. C. (2007). *The American journal of pathology* **170**, 1200-1209.
- Alvarez, A. R., Sandoval, P. C., Leal, N. R., Castro, P. U. & Kosik, K. S. (2004). *Neurobiol Dis* **17**, 326-336.
- Andersen, B. B., Gundersen, H. J. & Pakkenberg, B. (2003). *J Comp Neurol* **466**, 356-365.
- Annunziato, L., Pannaccione, A., Cataldi, M., Secondo, A., Castaldo, P., Di Renzo, G. & Taglialatela, M. (2002). *Neurobiol Aging* **23**, 819-834.
- Arrasate, M. & Finkbeiner, S. (2012). *Experimental neurology* **238**, 1-11.
- Baraibar, M. A. & Friguet, B. (2012). *Prog Mol Biol Transl Sci* **109**, 249-275.
- Bartke, A. & Westbrook, R. (2012). *Frontiers in genetics* **3**, 288.
- Beal, M. F., Kowall, N. W., Ellison, D. W., Mazurek, M. F., Swartz, K. J. & Martin, J. B. (1986). *Nature* **321**, 168-171.
- Becanovic, K., Norremolle, A., Neal, S. J., Kay, C., Collins, J. A., Arenillas, D., Lilja, T., Gaudenzi, G., Manoharan, S., Doty, C. N., Beck, J., Lahiri, N., Portales-Casamar, E., Warby, S. C., Connolly, C., De Souza, R. A., Network, R. I. o. t. E. H. s. D., Tabrizi, S. J., Hermanson, O., Langbehn, D. R., Hayden, M. R., Wasserman, W. W. & Leavitt, B. R. (2015). *Nat Neurosci* **18**, 807-816.
- Beckman, K. B. & Ames, B. N. (1998). *Physiological reviews* **78**, 547-581.
- Ben Moshe, T., Barash, H., Kang, T. B., Kim, J. C., Kovalenko, A., Gross, E., Schuchmann, M., Abramovitch, R., Galun, E. & Wallach, D. (2007). *Hepatology* **45**, 1014-1024.
- Bennett, I. J. & Madden, D. J. (2014). *Neuroscience* **276**, 187-205.
- Bernard, J. A. & Seidler, R. D. (2014). *Neuroscience and biobehavioral reviews* **42**, 193-207.
- Bodai, L., Pardi, N., Ujfaludi, Z., Bereczki, O., Komonyi, O., Balint, E. & Boros, I. M. (2007). *J Biol Chem* **282**, 36386-36393.
- Bordelon, Y. M. (2013). *Neurologic clinics* **31**, 1085-1094.
- Boucher, D., Blais, V. & Denault, J. B. (2012). *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 5669-5674.
- Boucher, D., Duclos, C. & Denault, J. B. (2014). *Methods in molecular biology* **1133**, 3-39.
- Breusing, N. & Grune, T. (2008a). *Biol Chem* **389**, 203-209.
- Breusing, N. & Grune, T. (2008b). *Biological Chemistry* **389**, 203-209.
- Brooks, S. P., Jones, L. & Dunnett, S. B. (2012). *Brain research bulletin* **88**, 81-93.
- Broughton, B. R., Reutens, D. C. & Sobey, C. G. (2009). *Stroke; a journal of cerebral circulation* **40**, e331-339.
- Bruckner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D. & Schlattner, U. (2009). *International journal of molecular sciences* **10**, 2763-2788.
- Butterfield, D. A., Swomley, A. M. & Sultana, R. (2013). *Antioxidants & redox signaling* **19**, 823-835.
- Carrard, G., Bulteau, A. L., Petropoulos, I. & Friguet, B. (2002). *The international journal of biochemistry & cell biology* **34**, 1461-1474.
- Cattaneo, E. & Conti, L. (1998). *J Neurosci Res* **53**, 223-234.
- Cattaneo, E., Zuccato, C. & Tartari, M. (2005). *Nature reviews. Neuroscience* **6**, 919-930.
- Celsi, F., Pizzo, P., Brini, M., Leo, S., Fotino, C., Pinton, P. & Rizzuto, R. (2009). *Biochim Biophys Acta* **1787**, 335-344.
- Chae, J. S., Gil Hwang, S., Lim, D. S. & Choi, E. J. (2012). *Free Radic Biol Med* **53**, 2335-2343.
- Chan, Y. W., Chen, Y. & Poon, R. Y. (2009). *Oncogene* **28**, 170-183.

- Chen, L. Y. & Chen, J. D. (2003). *Mol Cell Biol* **23**, 7108-7121.
- Chung, L. & Ng, Y. C. (2006). *Biochim Biophys Acta* **1762**, 103-109.
- Cooper, W. N., Hesson, L. B., Matallanas, D., Dallol, A., von Kriegsheim, A., Ward, R., Kolch, W. & Latif, F. (2009). *Oncogene* **28**, 2988-2998.
- Corpet, A., Olbrich, T., Gwerder, M., Fink, D. & Stucki, M. (2014). *Cell Cycle* **13**, 249-267.
- Creasy, C. L. & Chernoff, J. (1995). *Gene* **167**, 303-306.
- D'Amelio, M., Cavallucci, V. & Cecconi, F. (2010). *Cell Death Differ* **17**, 1104-1114.
- Daradkeh, G., Essa, M. M., Al-Adawi, S. S., Koshy, R. P., Al-Asmi, A. & Waly, M. I. (2014). *Pakistan journal of biological sciences : PJBS* **17**, 1098-1105.
- Davis, L. L. (2014). *Critical care nursing clinics of North America* **26**, 61-89.
- Del Prete, D., Checler, F. & Chami, M. (2014). *Mol Neurodegener* **9**, 21.
- Deng, Y., Pang, A. & Wang, J. H. (2003a). *J Biol Chem* **278**, 11760-11767.
- Deng, Y., Pang, A. & Wang, J. H. (2003b). *The Journal of biological chemistry* **278**, 11760-11767.
- Doyle, A., McGarry, M. P., Lee, N. A. & Lee, J. J. (2012). *Transgenic research* **21**, 327-349.
- Drane, P., Ouarrhni, K., Depaux, A., Shuaib, M. & Hamiche, A. (2010). *Genes Dev* **24**, 1253-1265.
- Ecsedy, J. A., Michaelson, J. S. & Leder, P. (2003). *Mol Cell Biol* **23**, 950-960.
- Emelyanov, A. V., Kovac, C. R., Sepulveda, M. A. & Birshstein, B. K. (2002). *The Journal of biological chemistry* **277**, 11156-11164.
- Ferrington, D. A., Husom, A. D. & Thompson, L. V. (2005). *FASEB J* **19**, 644-646.
- Fougere, B., Vellas, B., Billet, S., Martin, P. J., Gallucci, M. & Cesari, M. (2015). *Ageing research reviews* **24**, 299-303.
- Fukuyo, Y., Kitamura, T., Inoue, M., Horikoshi, N. T., Higashikubo, R., Hunt, C. R., Usheva, A. & Horikoshi, N. (2009). *Cancer Res* **69**, 7512-7517.
- Fulda, S. (2013). *Cancer letters* **338**, 168-173.
- Gangula, P. R., Dong, Y. L., Al-Hendy, A., Richard-Davis, G., Montgomery-Rice, V., Haddad, G., Millis, R., Nicholas, S. B. & Moseberry, D. (2013). *Frontiers in bioscience* **5**, 134-148.
- Garcia-Menendez, L., Karamanlidis, G., Kolwicz, S. & Tian, R. (2013). *American journal of physiology.Heart and circulatory physiology* **305**, H397-402.
- Gil-Mohapel, J. M. (2012). *CNS neuroscience & therapeutics* **18**, 77-86.
- Gines, S., Ivanova, E., Seong, I. S., Saura, C. A. & MacDonald, M. E. (2003). *J Biol Chem* **278**, 50514-50522.
- Gines, S., Seong, I. S., Fossale, E., Ivanova, E., Trettel, F., Gusella, J. F., Wheeler, V. C., Persichetti, F. & MacDonald, M. E. (2003). *Hum Mol Genet* **12**, 497-508.
- Giorgi, C., Bonora, M., Sorrentino, G., Missiroli, S., Poletti, F., Suski, J. M., Galindo Ramirez, F., Rizzuto, R., Di Virgilio, F., Zito, E., Pandolfi, P. P., Wieckowski, M. R., Mammano, F., Del Sal, G. & Pinton, P. (2015). *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 1779-1784.
- Giovinazzi, S., Lindsay, C. R., Morozov, V. M., Escobar-Cabrera, E., Summers, M. K., Han, H. S., McIntosh, L. P. & Ishov, A. M. (2012). *Oncogene* **31**, 13-26.
- Giralt, A., Puigdemivol, M., Carreton, O., Paoletti, P., Valero, J., Parra-Damas, A., Saura, C. A., Alberch, J. & Gines, S. (2012). *Hum Mol Genet* **21**, 1203-1216.
- Gora-Kupilas, K. & Josko, J. (2005). *Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences* **43**, 31-39.
- Gostissa, M., Hofmann, T. G., Will, H. & Del Sal, G. (2003). *Curr Opin Cell Biol* **15**, 351-357.
- Gostissa, M., Morelli, M., Mantovani, F., Guida, E., Piazza, S., Collavin, L., Brancolini, C., Schneider, C. & Del Sal, G. (2004). *J Biol Chem* **279**, 48013-48023.
- Graham, R. K., Deng, Y., Carroll, J., Vaid, K., Cowan, C., Pouladi, M. A., Metzler, M., Bissada, N., Wang, L., Faull, R. L., Gray, M., Yang, X. W., Raymond, L. A. & Hayden, M. R. (2010). *The*

- Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 15019-15029.
- Graham, R. K., Deng, Y., Slow, E. J., Haigh, B., Bissada, N., Lu, G., Pearson, J., Shehadeh, J., Bertram, L., Murphy, Z., Warby, S. C., Doty, C. N., Roy, S., Wellington, C. L., Leavitt, B. R., Raymond, L. A., Nicholson, D. W. & Hayden, M. R. (2006). *Cell* **125**, 1179-1191.
- Graham, R. K., Ehrnhoefer, D. E. & Hayden, M. R. (2011a). *Trends in neurosciences* **34**, 646-656.
- Graham, R. K., Ehrnhoefer, D. E. & Hayden, M. R. (2011b). *Trends Neurosci* **34**, 646-656.
- Graham, R. K., Riechers, S., Butland, S., Deng, Y., Skotte, N., Russ, J., Arunachalam, V., Wanker, E. & Hayden, M. R. (2012). *Society for Neuroscience Conference*.
- Gray, M., Shirasaki, D. I., Cepeda, C., Andre, V. M., Wilburn, B., Lu, X. H., Tao, J., Yamazaki, I., Li, S. H., Sun, Y. E., Li, X. J., Levine, M. S. & Yang, X. W. (2008). *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 6182-6195.
- Heallen, T., Zhang, M., Wang, J., Bonilla-Claudio, M., Klysik, E., Johnson, R. L. & Martin, J. F. (2011). *Science* **332**, 458-461.
- Hermel, E., Gafni, J., Propp, S. S., Leavitt, B. R., Wellington, C. L., Young, J. E., Hackam, A. S., Logvinova, A. V., Peel, A. L., Chen, S. F., Hook, V., Singaraja, R., Krajewski, S., Goldsmith, P. C., Ellerby, H. M., Hayden, M. R., Bredesen, D. E. & Ellerby, L. M. (2004). *Cell Death Differ* **11**, 424-438.
- Hofmann, T. G., Stollberg, N., Schmitz, M. L. & Will, H. (2003). *Cancer Res* **63**, 8271-8277.
- Hollenbach, A. D., McPherson, C. J., Mientjes, E. J., Iyengar, R. & Grosveld, G. (2002). *J Cell Sci* **115**, 3319-3330.
- Hollenbach, A. D., Sublett, J. E., McPherson, C. J. & Grosveld, G. (1999). *EMBO J* **18**, 3702-3711.
- Holter, S. M., Stromberg, M., Kovalenko, M., Garrett, L., Glasl, L., Lopez, E., Guide, J., Gotz, A., Hans, W., Becker, L., Rathkolb, B., Rozman, J., Schrewed, A., Klingenspor, M., Klopstock, T., Schulz, H., Wolf, E., Wursta, W., Gillis, T., Wakimoto, H., Seidman, J., MacDonald, M. E., Cotman, S., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., de Angelis, M. H., Lee, J. M. & Wheeler, V. C. (2013). *PLoS One* **8**, e80923.
- Huang, K., Yanai, A., Kang, R., Arstikaitis, P., Singaraja, R. R., Metzler, M., Mullard, A., Haigh, B., Gauthier-Campbell, C., Gutekunst, C. A., Hayden, M. R. & El-Husseini, A. (2004). *Neuron* **44**, 977-986.
- Itzhaki, O., Skutelsky, E., Kaptzan, T., Sinai, J., Michowitz, M., Huszar, M. & Leibovici, J. (2003). *Mech Ageing Dev* **124**, 999-1012.
- Jang, M. S., Ryu, S. W. & Kim, E. (2002). *Biochem Biophys Res Commun* **295**, 495-500.
- Jiang, C. H., Tsien, J. Z., Schultz, P. G. & Hu, Y. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1930-1934.
- Jin, J., Wang, G. L., Timchenko, L. & Timchenko, N. A. (2009). *Aging* **1**, 582-585.
- Jung, Y. S., Kim, H. Y., Lee, Y. J. & Kim, E. (2007). *FEBS Lett* **581**, 843-852.
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T., Siegelbaum, S. A. & Hudspeth, A. J. (2012). *Principles of Neural Science*, Fifth Edition ed.
- Karunakaran, S., Diwakar, L., Saeed, U., Agarwal, V., Ramakrishnan, S., Iyengar, S. & Ravindranath, V. (2007). *FASEB J* **21**, 2226-2236.
- Kegel, K. B., Meloni, A. R., Yi, Y., Kim, Y. J., Doyle, E., Cuiffo, B. G., Sapp, E., Wang, Y., Qin, Z. H., Chen, J. D., Nevins, J. R., Aronin, N. & DiFiglia, M. (2002). *J Biol Chem* **277**, 7466-7476.
- Keller, J. N., Dimayuga, E., Chen, Q., Thorpe, J., Gee, J. & Ding, Q. (2004). *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**, 2376-2391.
- Khelifi, A. F., D'Alcontres, M. S. & Salomoni, P. (2005). *Cell Death Differ* **12**, 724-733.
- Kilili, G. K. & Kyriakis, J. M. (2010). *J Biol Chem* **285**, 15076-15087.
- Killoran, A. & Biglan, K. M. (2014). *Mov Disord* **29**, 1404-1413.
- Kim, D., Shu, S., Coppola, M. D., Kaneko, S., Yuan, Z. Q. & Cheng, J. Q. (2010). *PLoS one* **5**, e9616.

- Kim, K. S., Hwang, H. A., Chae, S. K., Ha, H. & Kwon, K. S. (2005). *J Cell Biochem* **96**, 330-338.
- Kirkin, V., Joos, S. & Zornig, M. (2004). *Biochim Biophys Acta* **1644**, 229-249.
- Kong, P. J., Kil, M. O., Lee, H., Kim, S. S., Johnson, G. V. & Chun, W. (2009). *Neurological research* **31**, 77-83.
- Kuo, H. Y., Chang, C. C., Jeng, J. C., Hu, H. M., Lin, D. Y., Maul, G. G., Kwok, R. P. & Shih, H. M. (2005). *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16973-16978.
- Kuranaga, E. & Miura, M. (2007). *Trends Cell Biol* **17**, 135-144.
- Kwan, P. S., Lau, C. C., Chiu, Y. T., Man, C., Liu, J., Tang, K. D., Wong, Y. C. & Ling, M. T. (2013). *Carcinogenesis* **34**, 750-759.
- Lai, C.-Q., Parnell, L. D. & Ordovas, J. M. (2010). *Brocklehurst's Textbook of Geriatric Medicine and Gerontology (SEVENTH EDITION)*, edited by K. Rockwood & K. Woodhouse, pp. 38-41. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Laloti, V. S., Vergarajauregui, S., Pulido, D. & Sandoval, I. V. (2002). *The Journal of biological chemistry* **277**, 19783-19791.
- Laloti, V. S., Vergarajauregui, S., Tsuchiya, Y., Hernandez-Tiedra, S. & Sandoval, I. V. (2009). *J Cell Physiol* **218**, 416-426.
- Lamkanfi, M., Kanneganti, T. D., Van Damme, P., Vanden Berghe, T., Vanoverberghe, I., Vandekerckhove, J., Vandenabeele, P., Gevaert, K. & Nunez, G. (2008). *Molecular & cellular proteomics : MCP* **7**, 2350-2363.
- Landfield, P. W. (1996). *Life Sci* **59**, 399-404.
- Landles, C. & Bates, G. P. (2004). *EMBO reports* **5**, 958-963.
- LeBlanc, A. C. (2003). *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **27**, 215-229.
- LeBlanc, A. C. (2013). *Eur J Neurosci* **37**, 2005-2018.
- LeBlanc, A. C., Ramcharitar, J., Afonso, V., Hamel, E., Bennett, D. A., Pakavathkumar, P. & Albrecht, S. (2014). *Cell Death Differ* **21**, 696-706.
- Lee, K. K., Murakawa, M., Nishida, E., Tsubuki, S., Kawashima, S., Sakamaki, K. & Yonehara, S. (1998). *Oncogene* **16**, 3029-3037.
- Lee, K. K., Ohyama, T., Yajima, N., Tsubuki, S. & Yonehara, S. (2001). *The Journal of biological chemistry* **276**, 19276-19285.
- Lee, S. M., Kim, J. W., Jeong, Y. H., Kim, S. E., Kim, Y. J., Moon, S. J., Lee, J. H., Kim, K. J., Kim, M. K. & Kang, M. J. (2014). *Asian-Australasian journal of animal sciences* **27**, 1644-1651.
- Lee, S. T. & Kim, M. (2006). *Mech Ageing Dev* **127**, 432-435.
- Lessard-Beaudoin, M., Laroche, M., Demers, M. J., Grenier, G. & Graham, R. K. (2015). *Exp Gerontol* **63**, 27-34.
- Levkau, B., Scatena, M., Giachelli, C. M., Ross, R. & Raines, E. W. (1999). *Nat Cell Biol* **1**, 227-233.
- Li, P., Chen, Y., Mak, K. K., Wong, C. K., Wang, C. C. & Yuan, P. (2013). *PLoS One* **8**, e79867.
- Li, Q., Wang, X., Wu, X., Rui, Y., Liu, W., Wang, J., Wang, X., Liou, Y. C., Ye, Z. & Lin, S. C. (2007). *Cancer Res* **67**, 66-74.
- Li, X. J. & Li, S. (2011). *Neurobiol Dis* **43**, 4-8.
- Li, X. J., Li, S. H., Sharp, A. H., Nucifora, F. C., Jr., Schilling, G., Lanahan, A., Worley, P., Snyder, S. H. & Ross, C. A. (1995). *Nature* **378**, 398-402.
- Lim, J. H., Kim, E. N., Kim, M. Y., Chung, S., Shin, S. J., Kim, H. W., Yang, C. W., Kim, Y. S., Chang, Y. S., Park, C. W. & Choi, B. S. (2012a). *Oxid Med Cell Longev* **2012**, 171383.
- Lim, J. H., Kim, E. N., Kim, M. Y., Chung, S., Shin, S. J., Kim, H. W., Yang, C. W., Kim, Y. S., Chang, Y. S., Park, C. W. & Choi, B. S. (2012b). *Oxidative medicine and cellular longevity* **2012**, 171383.

- Lin, D. Y., Huang, Y. S., Jeng, J. C., Kuo, H. Y., Chang, C. C., Chao, T. T., Ho, C. C., Chen, Y. C., Lin, T. P., Fang, H. I., Hung, C. C., Suen, C. S., Hwang, M. J., Chang, K. S., Maul, G. G. & Shih, H. M. (2006). *Mol Cell* **24**, 341-354.
- Lin, D. Y. & Shih, H. M. (2002). *J Biol Chem* **277**, 25446-25456.
- Lindsay, C. R., Giovinazzi, S. & Ishov, A. M. (2009). *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **8**, 1544-1551.
- Lindsay, C. R., Morozov, V. M. & Ishov, A. M. (2008). *Front Biosci* **13**, 7132-7142.
- Liu, A. M., Wong, K. F., Jiang, X., Qiao, Y. & Luk, J. M. (2012). *Biochim Biophys Acta* **1826**, 357-364.
- Liu, W., Wu, J., Xiao, L., Bai, Y., Qu, A., Zheng, Z. & Yuan, Z. (2012). *PLoS One* **7**, e36562.
- Lukiw, W. J. (2004). *Neurochem Res* **29**, 1287-1297.
- Lynch, A. M. & Lynch, M. A. (2002). *Eur J Neurosci* **15**, 1779-1788.
- Ma, Q. & Devarajan, P. (2008). *Kidney Int* **74**, 310-318.
- Magnusson, K. R. (1998). *Front Biosci* **3**, e70-80.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Sellar, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trottier, Y., Lehrach, H., Davies, S. W. & Bates, G. P. (1996). *Cell* **87**, 493-506.
- Maston, G. A., Evans, S. K. & Green, M. R. (2006). *Annual review of genomics and human genetics* **7**, 29-59.
- Mateos, L., Persson, T., Katoozi, S., Gil-Bea, F. J. & Cedazo-Minguez, A. (2012). *Neurosci Lett* **506**, 245-250.
- Mather, K. A., Kwok, J. B., Armstrong, N. & Sachdev, P. S. (2014). *International journal of geriatric psychiatry* **29**, 1162-1171.
- Mazars, A., Fernandez-Vidal, A., Mondesert, O., Lorenzo, C., Prevost, G., Ducommun, B., Payrastre, B., Racaud-Sultan, C. & Manenti, S. (2009). *Cell Death Differ* **16**, 208-218.
- McGeer, E. G. & McGeer, P. L. (1976). *Nature* **263**, 517-519.
- McIlwain, D. R., Berger, T. & Mak, T. W. (2015). *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **7**.
- McLuskey, K. & Mottram, J. C. (2015). *Biochem J* **466**, 219-232.
- McStay, G. P., Salvesen, G. S. & Green, D. R. (2008). *Cell Death Differ* **15**, 322-331.
- Menalled, L. B. (2005). *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **2**, 465-470.
- Mersamer, P. I., Liu, Y., He, W., Hirschey, M. D., Chen, D. & Verdin, E. (2013). *Aging (Albany NY)* **5**, 144-150.
- Michaelson, J. S., Bader, D., Kuo, F., Kozak, C. & Leder, P. (1999). *Genes Dev* **13**, 1918-1923.
- Michaelson, J. S. & Leder, P. (2003). *Journal of cell science* **116**, 345-352.
- Milman, S., Atzmon, G., Huffman, D. M., Wan, J., Crandall, J. P., Cohen, P. & Barzilai, N. (2014). *Aging cell* **13**, 769-771.
- Montoya, A., Price, B. H., Menear, M. & Lepage, M. (2006). *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* **31**, 21-29.
- Myers, R. H., Vonsattel, J. P., Stevens, T. J., Cupples, L. A., Richardson, E. P., Martin, J. B. & Bird, E. D. (1988). *Neurology* **38**, 341-347.
- Nefkens, I., Negorev, D. G., Ishov, A. M., Michaelson, J. S., Yeh, E. T., Tanguay, R. M., Muller, W. E. & Maul, G. G. (2003). *J Cell Sci* **116**, 513-524.
- Niu, Y. L., Li, C. & Zhang, G. Y. (2011). *Arch Biochem Biophys* **515**, 89-98.
- O'Neill, E. & Kolch, W. (2005). *Cell Cycle* **4**, 365-367.
- O'Neill, E., Rushworth, L., Baccarini, M. & Kolch, W. (2004). *Science* **306**, 2267-2270.
- O'Neill, E. E., Matallanas, D. & Kolch, W. (2005). *Cancer research* **65**, 5485-5487.
- Oh, S., Lee, D., Kim, T., Kim, T. S., Oh, H. J., Hwang, C. Y., Kong, Y. Y., Kwon, K. S. & Lim, D. S. (2009). *Mol Cell Biol* **29**, 6309-6320.
- Orrenius, S., Gogvadze, V. & Zhivotovsky, B. (2015). *Biochem Biophys Res Commun* **460**, 72-81.

- Pan, W. W., Yi, F. P., Cao, L. X., Liu, X. M., Shen, Z. F., Bu, Y. Q., Xu, Y., Fan, H. Y. & Song, F. Z. (2013). *Gene* **526**, 287-294.
- Papa, S. & Skulachev, V. P. (1997). *Molecular and cellular biochemistry* **174**, 305-319.
- Patten, D. A., Germain, M., Kelly, M. A. & Slack, R. S. (2010). *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **20 Suppl 2**, S357-367.
- Pattison, L. R., Kotter, M. R., Fraga, D. & Bonelli, R. M. (2006). *J Neurol* **253**, 1137-1142.
- Perlman, R., Schiemann, W. P., Brooks, M. W., Lodish, H. F. & Weinberg, R. A. (2001). *Nat Cell Biol* **3**, 708-714.
- Pineiro, D., Ramajo, J., Bradrick, S. S. & Martinez-Salas, E. (2012a). *Nucleic Acids Res* **40**, 4942-4953.
- Pineiro, D., Ramajo, J., Bradrick, S. S. & Martinez-Salas, E. (2012b). *Nucleic acids research* **40**, 4942-4953.
- Pluta, A. F., Earnshaw, W. C. & Goldberg, I. G. (1998). *J Cell Sci* **111 ( Pt 14)**, 2029-2041.
- Pouladi, M. A., Graham, R. K., Karasinska, J. M., Xie, Y., Santos, R. D., Petersen, A. & Hayden, M. R. (2009a). *Brain* **132**, 919-932.
- Pouladi, M. A., Graham, R. K., Karasinska, J. M., Xie, Y., Santos, R. D., Petersen, A. & Hayden, M. R. (2009b). *Brain : a journal of neurology* **132**, 919-932.
- Pouladi, M. A., Morton, A. J. & Hayden, M. R. (2013). *Nature reviews. Neuroscience* **14**, 708-721.
- Praskova, M., Xia, F. & Avruch, J. (2008). *Current biology : CB* **18**, 311-321.
- Pringsheim, T., Wiltshire, K., Day, L., Dykeman, J., Steeves, T. & Jette, N. (2012). *Mov Disord* **27**, 1083-1091.
- Qin, F., Tian, J., Zhou, D. & Chen, L. (2013). *Cell Biosci* **3**, 31.
- Ramaswamy, S., McBride, J. L. & Kordower, J. H. (2007). *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* **48**, 356-373.
- Ramcharitar, J., Afonso, V. M., Albrecht, S., Bennett, D. A. & LeBlanc, A. C. (2013). *Neurobiol Aging* **34**, 1815-1824.
- Riechers, S., Butland, S., Deng, Y., Skotte, N., Ehrnhoefer, D. E., Russ, J., Laine, J., Laroche, M., Pouladi, M. A., Wanker, E., Hayden, M. R. & Graham, R. K. (2016a). *Human molecular genetics*.
- Riechers, S. P., Butland, S., Deng, Y., Skotte, N., Ehrnhoefer, D. E., Russ, J., Laine, J., Laroche, M., Pouladi, M. A., Wanker, E. E., Hayden, M. R. & Graham, R. K. (2016b). *Hum Mol Genet* **25**, 1600-1618.
- Rohn, T. T. (2010). *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death* **15**, 1403-1409.
- Rosas, H. D., Liu, A. K., Hersch, S., Glessner, M., Ferrante, R. J., Salat, D. H., van der Kouwe, A., Jenkins, B. G., Dale, A. M. & Fischl, B. (2002). *Neurology* **58**, 695-701.
- Rosas, H. D., Salat, D. H., Lee, S. Y., Zaleta, A. K., Pappu, V., Fischl, B., Greve, D., Hevelone, N. & Hersch, S. M. (2008). *Brain* **131**, 1057-1068.
- Roth, K. A. (2001). *Journal of neuropathology and experimental neurology* **60**, 829-838.
- Roubille, F., Combes, S., Leal-Sanchez, J., Barrere, C., Cransac, F., Sportouch-Dukhan, C., Gahide, G., Serre, I., Kupfer, E., Richard, S., Hueber, A. O., Nargeot, J., Piot, C. & Barrere-Lemaire, S. (2007). *Circulation* **116**, 2709-2717.
- Ruiz-Torres, P., Lucio, J., Gonzalez-Rubio, M., Rodriguez-Puyol, M. & Rodriguez-Puyol, D. (1997). *Free Radic Biol Med* **22**, 49-56.
- Saavedra, A., Garcia-Martinez, J. M., Xifro, X., Giral, A., Torres-Peraza, J. F., Canals, J. M., Diaz-Hernandez, M., Lucas, J. J., Alberch, J. & Perez-Navarro, E. (2010). *Cell Death Differ* **17**, 324-335.
- Saeed, U., Karunakaran, S., Meka, D. P., Koumar, R. C., Ramakrishnan, S., Joshi, S. D., Nidadavolu, P. & Ravindranath, V. (2009). *Neurotox Res* **16**, 116-126.



- Salomoni, P., Guernah, I. & Pandolfi, P. P. (2006). *Cell Death Differ* **13**, 672-675.
- Salomoni, P. & Khelifi, A. F. (2006). *Trends Cell Biol* **16**, 97-104.
- Sanphui, P. & Biswas, S. C. (2013). *Cell death & disease* **4**, e625.
- Santer, R. (2010). *Brocklehurst's Textbook of Geriatric Medicine and Gerontology (SEVENTH EDITION)*, edited by K. Rockwood & K. Woodhouse, pp. 42-50. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Schwarcz, R., Foster, A. C., French, E. D., Whetsell, W. O., Jr. & Kohler, C. (1984). *Life Sci* **35**, 19-32.
- Schwerk, C. & Schulze-Osthoff, K. (2003). *Biochemical pharmacology* **66**, 1453-1458.
- Scott, F. L., Fuchs, G. J., Boyd, S. E., Denault, J. B., Hawkins, C. J., Dequiedt, F. & Salvesen, G. S. (2008). *J Biol Chem* **283**, 19499-19510.
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S. & Kumar, S. (2015). *Cell Death Differ* **22**, 526-539.
- Sherlock, M. & Toogood, A. A. (2007). *Pituitary* **10**, 189-203.
- Sheydina, A., Riordon, D. R. & Boheler, K. R. (2011a). *Clin Sci (Lond)* **121**, 315-329.
- Sheydina, A., Riordon, D. R. & Boheler, K. R. (2011b). *Clinical science (London, England : 1979)* **121**, 315-329.
- Shimohama, S., Tanino, H. & Fujimoto, S. (2001). *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 1063-1066.
- Slee, E. A., Adrain, C. & Martin, S. J. (2001). *J Biol Chem* **276**, 7320-7326.
- Slow, E. J., van Raamsdonk, J., Rogers, D., Coleman, S. H., Graham, R. K., Deng, Y., Oh, R., Bissada, N., Hossain, S. M., Yang, Y. Z., Li, X. J., Simpson, E. M., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R. & Hayden, M. R. (2003). *Human molecular genetics* **12**, 1555-1567.
- Snigdha, S., Smith, E. D., Prieto, G. A. & Cotman, C. W. (2012). *Neuroscience bulletin* **28**, 14-24.
- Song, J., Hong, H. R., Yamashita, E., Park, I. Y. & Lee, S. J. (2015). *Journal of biochemistry*.
- Song, J., Park, K. A., Lee, W. T. & Lee, J. E. (2014). *International journal of molecular sciences* **15**, 2119-2129.
- Song, J. J. & Lee, Y. J. (2003). *The Journal of biological chemistry* **278**, 47245-47252.
- Song, J. J. & Lee, Y. J. (2004a). *J Biol Chem* **279**, 30573-30578.
- Song, J. J. & Lee, Y. J. (2004b). *J Cell Biochem* **92**, 1257-1270.
- Song, J. J. & Lee, Y. J. (2008). *Cellular signalling* **20**, 892-906.
- Stack, E. C., Kubilus, J. K., Smith, K., Cormier, K., Del Signore, S. J., Guelin, E., Ryu, H., Hersch, S. M. & Ferrante, R. J. (2005). *The Journal of comparative neurology* **490**, 354-370.
- Steffan, J. S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y. Z., Gohler, H., Wanker, E. E., Bates, G. P., Housman, D. E. & Thompson, L. M. (2000). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6763-6768.
- Su, B., Yang, Y. B., Tuo, Q. H., Zhu, B. Y., Lei, X. Y., Yin, W. & Liao, D. F. (2007). *Cardiovasc Drugs Ther* **21**, 37-45.
- Subburaju, S., Coleman, A. J., Ruzicka, W. B. & Benes, F. M. (2016). *Translational psychiatry* **6**, e723.
- Suh, Y. (2002a). *Mech Ageing Dev* **123**, 881-890.
- Suh, Y. (2002b). *Mechanisms of ageing and development* **123**, 881-890.
- Tang, J., Agrawal, T., Cheng, Q., Qu, L., Brewer, M. D., Chen, J. & Yang, X. (2013). *PloS one* **8**, e55813.
- Tang, J., Qu, L. K., Zhang, J., Wang, W., Michaelson, J. S., Degenhardt, Y. Y., El-Deiry, W. S. & Yang, X. (2006). *Nature cell biology* **8**, 855-862.
- Terman, A., Kurz, T., Navratil, M., Arriaga, E. A. & Brunk, U. T. (2010). *Antioxidants & redox signaling* **12**, 503-535.
- Torii, S., Egan, D. A., Evans, R. A. & Reed, J. C. (1999). *EMBO J* **18**, 6037-6049.
- Trettel, F., Rigamonti, D., Hilditch-Maguire, P., Wheeler, V. C., Sharp, A. H., Persichetti, F., Cattaneo, E. & MacDonald, M. E. (2000). *Hum Mol Genet* **9**, 2799-2809.

- Ureshino, R. P., Bertoncini, C. R., Fernandes, M. J., Abdalla, F. M., Porto, C. S., Hsu, Y. T., Lopes, G. S. & Smaili, S. S. (2010). *J Neurosci Res* **88**, 438-447.
- Van Raamsdonk, J. M., Pearson, J., Slow, E. J., Hossain, S. M., Leavitt, B. R. & Hayden, M. R. (2005). *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 4169-4180.
- Vonsattel, J. P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D. & Richardson, E. P., Jr. (1985). *J Neuropathol Exp Neurol* **44**, 559-577.
- Waak, J., Weber, S. S., Gorner, K., Schall, C., Ichijo, H., Stehle, T. & Kahle, P. J. (2009). *J Biol Chem* **284**, 14245-14257.
- Waldvogel, H. J., Kim, E. H., Thu, D. C., Tippet, L. J. & Faull, R. L. (2012). *Journal of Huntington's disease* **1**, 143-153.
- Wang, X. J., Cao, Q., Zhang, Y. & Su, X. D. (2015). *Annual review of pharmacology and toxicology* **55**, 553-572.
- Wanker, E. E., Rovira, C., Scherzinger, E., Hasenbank, R., Walter, S., Tait, D., Colicelli, J. & Lehrach, H. (1997). *Hum Mol Genet* **6**, 487-495.
- Warby, S. C., Doty, C. N., Graham, R. K., Carroll, J. B., Yang, Y. Z., Singaraja, R. R., Overall, C. M. & Hayden, M. R. (2008). *Hum Mol Genet* **17**, 2390-2404.
- Ward, W. F. (2002). *Progress in molecular and subcellular biology* **29**, 35-42.
- Wheeler, V. C., Gutekunst, C. A., Vrbancic, V., Lebel, L. A., Schilling, G., Hersch, S., Friedlander, R. M., Gusella, J. F., Vonsattel, J. P., Borchelt, D. R. & MacDonald, M. E. (2002). *Hum Mol Genet* **11**, 633-640.
- Wren, B. G. (1992). *The Medical journal of Australia* **157**, 204-208.
- Wu, S., Loke, H. N. & Rehemtulla, A. (2002). *Neoplasia* **4**, 486-492.
- Xiao, L., Chen, D., Hu, P., Wu, J., Liu, W., Zhao, Y., Cao, M., Fang, Y., Bi, W., Zheng, Z., Ren, J., Ji, G., Wang, Y. & Yuan, Z. (2011). *J Neurosci* **31**, 9611-9619.
- Xiong, G., Li, L., Sun, S., Li, T., Liao, D., Shu, C. & Tuo, Q. (2014). *Mol Biol Rep* **41**, 7183-7190.
- Xu, J., Kobayashi, S., Yamaguchi, S., Iijima, K., Okada, K. & Yamashita, K. (2000). *AJNR. American journal of neuroradiology* **21**, 112-118.
- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H. Y. & Baltimore, D. (1997). *Cell* **89**, 1067-1076.
- Zhang, C., Zhu, Q. & Hua, T. (2010). *Cell Tissue Res* **341**, 341-347.
- Zhang, J. H., Zhang, Y. & Herman, B. (2003). *Ageing research reviews* **2**, 357-366.
- Zhang, Y., Chong, E. & Herman, B. (2002). *Exp Gerontol* **37**, 777-789.
- Zhao, L. Y., Liu, J., Sidhu, G. S., Niu, Y., Liu, Y., Wang, R. & Liao, D. (2004). *The Journal of biological chemistry* **279**, 50566-50579.
- Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D. & Pandolfi, P. P. (2000). *J Exp Med* **191**, 631-640.
- Zhou, D., Zhang, Y., Wu, H., Barry, E., Yin, Y., Lawrence, E., Dawson, D., Willis, J. E., Markowitz, S. D., Camargo, F. D. & Avruch, J. (2011). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, E1312-1320.
- Zobalova, R., Swettenham, E., Chladova, J., Dong, L. F. & Neuzil, J. (2008). *Redox Rep* **13**, 263-270.